

V. DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados obtenidos en la presente Tesis ponen de manifiesto la existencia de una importante interacción anatómica y funcional entre la corteza prefrontal medial y los núcleos del rafe. El control recíproco ejercido entre estas dos áreas cerebrales es tal que la mayor parte de las neuronas 5-HT registradas respondieron a la estimulación eléctrica de la CPFm y, a su vez, prácticamente todas las neuronas piramidales registradas en la CPFm respondieron a la estimulación eléctrica del NDR y/o del NMR.

5.1. La corteza prefrontal medial controla la actividad del núcleo dorsal del rafe

La CPFm controla la actividad de las neuronas serotoninérgicas del NDR a través de un mecanismo que implica a la autoinhibición serotoninérgica y a la transmisión GABAérgica, tras una excitación inicial glutamatérgica. Varios trabajos describen la existencia de vías descendentes entre diversas áreas de la CPFm y los NR (Sesack *et al.*, 1989; Takagishi y Chiba, 1991; Peyron *et al.*, 1998; Hajós *et al.*, 1998; Heidbreder y Groenewegen, 2003; Vertes, 2004; Jankowski y Sesack, 2004). En nuestros trabajos registramos numerosas neuronas piramidales de la corteza cingulada, prelímbica e infralímbica que responden activándose antidrómicamente a la estimulación eléctrica del NDR y el NMR. Estas observaciones corroboran los estudios histológicos de trazado e indican que existe una importante conexión anatómica entre todas las zonas de la CPFm y los núcleos dorsal y medial del rafe.

La naturaleza de las aferencias de la CPFm al NDR es excitadora. Al estimular eléctricamente la CPFm registramos excitaciones ortodrómicas (con una latencia que concuerda con una conexión monosináptica) que bloqueamos con antagonistas de los receptores ionotrópicos del glutamato (iGluR) NMDA y AMPA/KA, confirmando datos obtenidos *in vitro* (Pan y Williams, 1989). Además, se produce un aumento en la liberación de 5-HT en el NDR a través de un mecanismo que implica a los receptores NMDA, en concordancia con lo observado tras la aplicación local de agonistas AMPA/KA y NMDA en el propio NDR (Tao *et al.*, 1997; Tao y Auerbach, 2000).

Sin embargo, aunque la naturaleza de esta vía descendente es excitadora registramos mayoritariamente respuestas inhibitorias. Esta aparente contradicción se explica por el papel de los autoreceptores 5-HT_{1A}. Se sabe que en el NDR estos receptores se encuentran en el soma y las dendritas de las neuronas 5-HT (Vergé *et al.*, 1985; Sotelo *et al.*, 1990; Riad *et al.*, 2000), donde actúan limitando el exceso de actividad serotoninérgica. Nuestros resultados indican que este mecanismo de autocontrol lo utilizan las neuronas 5-HT del NDR frente a la activación cortical ya que bloqueamos, aunque parcialmente, las inhibiciones de las neuronas 5-HT con el antagonista 5-HT_{1A} WAY-100635 y porque el inhibidor de la síntesis de 5-HT PCPA disminuye el número de inhibiciones, implicando a la 5-HT en este tipo de respuestas. El papel autolimitante de la actividad serotoninérgica ejercido por los autoreceptores 5-HT_{1A} se pone de manifiesto al estimular la CPFm a frecuencias altas. En animales control no aumenta la frecuencia de descarga de las neuronas 5-HT porque la actividad se autoinhibe, mientras que en animales tratados con PCPA no existe este autocontrol y la frecuencia de descarga aumenta.

Finalmente, las aferencias de la CPFm excitan a interneuronas GABAérgicas que, a su vez, inhiben a las neuronas 5-HT a través de la activación de receptores GABA_A. Este mecanismo se ha descrito también en otros circuitos cerebrales (Aguilar *et al.*, 2002). Paralelamente, la estimulación de la porción IL de la CPFm genera excitaciones ortodrómicas en interneuronas GABAérgicas del NDR con una latencia similar a la observada en nuestro trabajo (Varga *et al.*, 2001) y estas conexiones se han confirmado anatómicamente (Jankowski y Sesack, 2004).

5.2. Control de la actividad del circuito corteza prefrontal medial-núcleos del rafe por receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} corticales y glutamato

Tanto el NDR como el NMR proyectan extensamente a la corteza prefrontal (O'Hearn y Molliver, 1984; Kosofsky y Molliver, 1987). Dada la gran conectividad entre la CPFm y los NR hemos estudiado la influencia que ejerce la actividad cortical sobre la serotoninérgica y utilizado la liberación prefrontal de 5-HT como indicador del grado de activación del circuito que se establece entre estas dos áreas cerebrales.

Papel de los receptores 5-HT_{1A} postsinápticos en la modulación de la actividad del circuito corteza prefrontal medial-núcleos del rafe

Algunos estudios sugieren que los receptores 5-HT_{1A} postsinápticos controlan de forma distal la actividad serotoninérgica (Blier *et al.*, 1987; Ceci *et al.*, 1994; Romero *et al.*, 1994; Hajós *et al.*, 1999; Martín-Ruiz y Ugedo, 2001). Trabajos anteriores de nuestro grupo muestran como agonistas 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT y BAYx3702) administrados localmente en CPFm disminuyen la liberación de 5-HT en este área, efecto revertido por la administración local del antagonista 5-HT_{1A} WAY-100635 (Casanovas *et al.*, 1999). Además, la aplicación local de 8-OH-DPAT en CPFm disminuye tanto la frecuencia de descarga de las neuronas 5-HT como la liberación de 5-HT en el NDR. La administración sistémica de 8-OH-DPAT disminuye la liberación de 5-HT tanto en el NDR como en la CPFm y este efecto es bloqueado por la administración local del antagonista 5-HT_{1A} WAY-100635 en ambas zonas. Estos resultados demuestran que la activación de receptores 5-HT_{1A} en la CPFm reduce la actividad serotoninérgica y la liberación de 5-HT.

Papel de los receptores 5-HT_{2A} postsinápticos en la modulación de la actividad del circuito corteza prefrontal medial-núcleos del rafe

Los resultados presentados en el Trabajo 2 evidencian que receptores 5-HT_{2A} localizados en la CPFm controlan la actividad serotoninérgica. La administración local del agonista parcial 5-HT_{2A/2C} DOI en CPFm aumenta la frecuencia de descarga del 50 % de las neuronas 5-HT del NDR, probablemente a través de aferencias excitadoras directas desde la CPFm. En segundo lugar, la administración local de DOI en CPFm aumenta la liberación de 5-HT en esta zona, efecto revertido por M100907. Por un lado, la sensibilidad a tetrodotoxina descarta que el efecto del DOI sea de tipo amfetamínico y por otro, el DOI no está actuando sobre receptores 5-HT_{2A} localizados en terminales serotoninérgicos corticales ya que las neuronas 5-HT no expresan este receptor (Fay y Kubin, 2000). En conjunto, estos resultados revelan que la activación de receptores 5-HT_{2A} en la CPFm aumenta la actividad de las neuronas 5-HT y la liberación de 5-HT en corteza cerebral a través de impulso nervioso.

Sin embargo, la administración sistémica de DOI disminuye tanto la actividad serotoninérgica del NDR como la liberación de 5-HT en la CPFm. Este efecto se produce a través de la activación de receptores 5-HT_{2A} localizados, posiblemente, en interneuronas GABAérgicas. Estudios electrofisiológicos *in vitro* señalan que tanto 5-HT como DOI aumentan el control GABAérgico de neuronas 5-HT a través del receptor 5-HT_{2A} (Liu *et al.*, 2000). Experimentos *in vivo* describen los efectos inhibitorios de la administración sistémica de DOI sobre la actividad serotoninérgica del NDR (Wright *et al.*, 1990; Garratt *et al.*, 1991). Nuestros resultados sugieren que existe un control GABAérgico de la actividad de las neuronas 5-HT *in vivo* a través de receptores 5-HT_{2A} localizados en aferencias GABAérgicas a las neuronas 5-HT, ya que la inhibición de la actividad serotoninérgica inducida por DOI se revierte por M100907 y por el antagonista del receptor GABA_A picrotoxinina. La mitad de las neuronas 5-HT registradas se inhiben sólo parcialmente tras la administración sistémica de DOI. En estas neuronas podría existir un equilibrio entre la inhibición producida por neuronas GABAérgicas que expresan receptores 5-HT_{2A} y la excitación ejercida por aferencias glutamatérgicas de neuronas piramidales que también expresan el receptor 5-HT_{2A}.

Papel del glutamato en los efectos excitadores de la activación del receptor 5-HT_{2A} cortical. Implicación de las aferencias talámicas

El aumento en la liberación de 5-HT producido por la administración local de DOI en CPFm se revierte por un antagonista AMPA/KA (NBQX) y no por un antagonista NMDA (MK-801). De forma análoga, la perfusión de AMPA produce un aumento en la liberación de 5-HT similar a la inducida por DOI. Por otra parte, la reducción de la transmisión glutamatérgica mediante la aplicación local de agonistas de los receptores metabotrópicos del glutamato (mGluR) II/III 1S,3S-ACPD y LY 379268, que inhiben presinápticamente la liberación de glutamato y postsinápticamente la actividad de las neuronas corticales, revierte el aumento de 5-HT producido por DOI. Estos resultados indican que existe una interacción entre la activación del receptor 5-HT_{2A} y la transmisión glutamatérgica en la CPFm.

De acuerdo con nuestros resultados, estudios en rodaja de CPF muestran que el aumento de excitabilidad de neuronas piramidales inducido por 5-HT depende de

receptores 5-HT_{2A} y se revierte por antagonistas AMPA/KA y agonistas mGluR (Aghajanian y Marek, 1997, 1999b; Marek *et al.*, 2000).

Asimismo, cuando aumentamos las concentraciones extracelulares de glutamato endógeno, ya sea bloqueando su recaptación neuronal y glial mediante L-*trans*-PDC, ya sea incrementando su liberación desde terminales talámicos tras la estimulación eléctrica del tálamo, la liberación cortical de 5-HT aumenta. La desinhibición química del tálamo por bicuculina produce un incremento similar en la liberación cortical de 5-HT y, además, aumenta de forma muy marcada la frecuencia de descarga de las neuronas piramidales de CPFm.

El mecanismo implicado en la interacción de la neurotransmisión 5-HT y glutamatérgica en CPFm no está claro y existen opiniones controvertidas sobre el origen del glutamato y la localización de los receptores 5-HT_{2A} que median los efectos excitadores sobre la actividad cortical. Una limitación técnica importante para poder dilucidar este mecanismo es el hecho de que los niveles extracelulares de glutamato medidos por HPLC no son representativos del glutamato liberado en procesos de neurotransmisión, sino del glutamato metabólico, que depende de un intercambiador de cisteína-glutamato (Timmerman y Westerink, 1997; Baker y Kalivas, 2000).

A pesar de la elevada densidad de receptores 5-HT_{2A} en la dendrita apical de las neuronas piramidales, Aghajanian y Marek han propuesto que la población de receptores 5-HT_{2A} responsables de la activación cortical por 5-HT se localiza en terminales talamo-corticales y que sería el glutamato procedente del tálamo el que activaría receptores AMPA/KA en las neuronas piramidales produciendo, así, un aumento de su excitabilidad. Esta argumentación surge de distintas observaciones experimentales. En estudios realizados en rodaja de corteza, el aumento en la excitabilidad de las neuronas piramidales por la aplicación de 5-HT se reduce mediante agonistas μ -opioides y lesiones del tálamo. Se ha sugerido la presencia de receptores μ -opioides en terminales talámicos de corteza debido a que la proteína se detecta principalmente en corteza y su ARNm en el tálamo (Delfs *et al.*, 1994; Zastawny *et al.*, 1994). Además, se trata de un mecanismo presináptico porque la activación de los receptores μ -opioides por DAMGO no suprime la excitación AMPA (Marek y Aghajanian, 1998; Marek *et al.*, 2001). Sin embargo, en estos estudios las lesiones del tálamo disminuyen la densidad de receptores μ -opioides y aumentan la

densidad de receptores 5-HT_{2A} en CPFm, lo que es discordante con la existencia de receptores 5-HT_{2A} en terminales talamo-corticales. Otro trabajo muestra como la administración sistémica de DOI incrementa la expresión de Fos en CPFm, y este efecto depende de receptores AMPA/KA y de la integridad del tálamo (Scruggs *et al.*, 2000).

Los resultados del Trabajo 3 muestran que el aumento de liberación de 5-HT en CPFm tras la desinhibición del tálamo se revierte por la perfusión del agonista μ -opioide DAMGO y de agentes que reducen la transmisión glutamatérgica: antagonistas AMPA/KA (NBQX) y agonistas mGluR II/III (1S-3S-ACPD y LY 379268). Sin embargo, el incremento en la liberación de 5-HT producido por DOI ni se antagoniza ni se revierte por DAMGO, lo que sugiere que el DOI no está activando terminales talamo-corticales sino que está actuando postsinápticamente.

Además, lesiones electrolíticas del tálamo, en las mismas coordenadas en las que Marek y colaboradores (2001) observan una disminución de la excitabilidad piramidal inducida por 5-HT, no alteran los efectos producidos por la administración sistémica de DOI sobre la actividad de las neuronas piramidales (ver más adelante) ni el aumento de la liberación cortical de 5-HT tras la aplicación local de DOI en CPFm. Además, estos efectos dependen de la activación de receptores 5-HT_{2A}, ya que se bloquean con M100907 incluso 8 días después de la lesión, cuando los terminales talámicos de los núcleos lesionados han degenerado.

Estos resultados sugieren que el glutamato procedente de las aferencias talamo-corticales no es el responsable del incremento en la actividad cortical producido por la activación de receptores 5-HT_{2A}. Trabajos publicados recientemente refuerzan nuestros resultados: en la CPFm los receptores 5-HT_{2A} se localizan principalmente a nivel postsináptico, en espinas de neuronas piramidales y dendritas piramidales y GABAérgicas; una pequeña proporción se encuentra a nivel presináptico, pero en terminales con un perfil monoaminérgico y muy raramente en terminales glutamatérgicos (Miner *et al.*, 2003).

Queda por determinar la naturaleza de la interacción entre los receptores 5-HT_{2A} y la neurotransmisión glutamatérgica mediada por receptores AMPA en las neuronas piramidales de CPFm. Sin embargo, no sería descabellado pensar que la activación de receptores 5-HT_{2A} (acoplados a fosfolipasa C) en neuronas piramidales induce un aumento de Ca²⁺ intracelular (Pritchett *et al.*, 1988) análogo al producido por la

activación de receptores NMDA. Este efecto se ha relacionado con la presencia de LTP y está mediado por un reclutamiento de receptores AMPA del compartimento intracelular a la membrana, lo que provoca un aumento inmediato de la respuesta neuronal al glutamato (Malenka y Nicoll, 1999).

5.3 Modulación serotoninérgica de la actividad de neuronas prefrontales

La corteza cerebral está densamente innervada por fibras serotoninérgicas (O'Hearn y Molliver, 1984; Kosofsky y Molliver, 1987; Blue *et al.*, 1988). A nivel funcional la 5-HT ejerce efectos complejos en la actividad de las neuronas corticales a través de numerosos receptores. Así, la aplicación microiontóforética de 5-HT en la corteza cerebral *in vivo* inhibe la frecuencia de descarga de las neuronas corticales (Lakoski y Aghajanian, 1985; Ashby *et al.*, 1992; Jacobs y Azmitia, 1992), mientras que estudios *in vitro* describen tanto respuestas inhibitorias como excitadoras (Araneda y Andrade, 1991; Tanaka y North, 1993; Aghajanian y Marek, 1997, 1999b, 2000; Arvanov *et al.*, 1999; Zhou y Hablitz, 1999). Al igual que los estudios realizados *in vivo*, los resultados del Trabajo 5 muestran que el efecto predominante de la 5-HT en corteza es inhibitorio, a pesar de la presencia de una elevada densidad de receptores excitadores 5-HT_{2A} (López-Giménez *et al.*, 1997). La 5-HT liberada tras la estimulación eléctrica del NDR y NMR induce respuestas inhibitorias en el 66% de las neuronas piramidales registradas, frente al 13% de excitaciones ortodrómicas puras y 20% de respuestas bifásicas, de acuerdo con datos publicados anteriormente (Mantz *et al.*, 1990; Tanaka y North, 1993).

Control de la actividad de neuronas piramidales de corteza prefrontal por receptores 5-HT_{1A}

Se ha descrito la presencia de receptores 5-HT_{1A} en la CPFm (Pompeiano *et al.*, 1992; Kia *et al.*, 1996a), que se expresan mayoritariamente en neuronas piramidales y, en proporción muy inferior, en interneuronas GABAérgicas (Santana *et al.*, 2004).

La activación de estos receptores en neuronas piramidales es la responsable, en parte, de las acciones hiperpolarizantes que la 5-HT induce *in vitro* (Araneda y Andrade, 1991). En los Trabajos 4 y 5 registramos respuestas inhibitorias en neuronas piramidales de CPFm y neuronas de corteza MOs mediadas por este receptor, ya que se bloquean con el antagonista 5-HT_{1A} WAY-100635. La figura 16 muestra un esquema de la posible localización de los receptores 5-HT_{1A} en las neuronas piramidales, cuya activación sería la responsable de la mayor parte de las inhibiciones registradas en las neuronas piramidales tras la estimulación eléctrica de los núcleos dorsal y medial del rafe.

Control de la actividad de neuronas piramidales de corteza prefrontal por receptores 5-HT_{2A}

En la corteza cerebral los receptores 5-HT_{2A} se expresan densamente en las neuronas piramidales y en menor proporción en interneuronas GABAérgicas (Willins *et al.*, 1997; Hamada *et al.*, 1998; Jakab y Goldman-Rakic, 1998; Santana *et al.*, 2004). Estudios *in vitro* señalan que la activación del receptor 5-HT_{2A} cortical induce efectos opuestos en las neuronas piramidales, registrándose tanto despolarizaciones como hiperpolarizaciones (Aghajanian y Marek, 1997, 1999a, 2000; Araneda y Andrade, 1991; Tanaka y North, 1993; Arvanov *et al.*, 1999), estas últimas mediadas, probablemente, por los receptores 5-HT_{2A} localizados en interneuronas GABAérgicas (Zhou y Hablitz, 1999).

Las excitaciones ortodrómicas que registramos en las neuronas piramidales tras la estimulación eléctrica de los NR están mediadas por receptores 5-HT_{2A}, ya que se bloquean con M100907, lo que indica que la 5-HT endógena es capaz de activar a estos receptores *in vivo*.

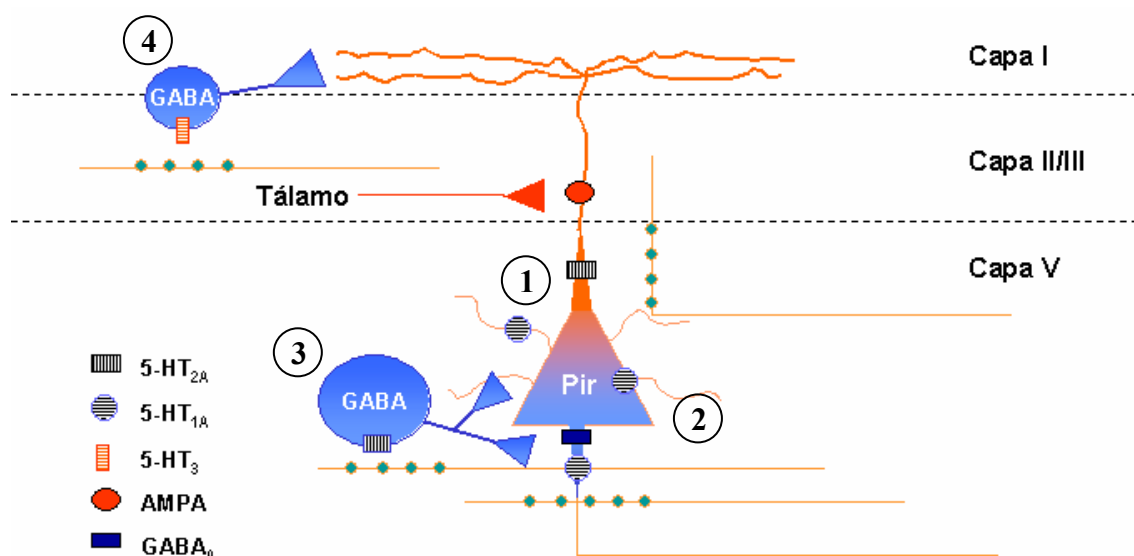


Figura 16. Representación esquemática de la posible localización de receptores serotoninérgicos en la corteza prefrontal medial. La 5-HT despolariza las neuronas piramidales activando receptores 5-HT_{2A} localizados en la dendrita apical (1). Además, la 5-HT inhibe a las neuronas piramidales directamente a través de receptores 5-HT_{1A} localizados en el compartimento somatodendrítico o en la porción proximal del axón (2) o indirectamente a través de la activación de interneuronas GABAérgicas que expresan el receptor 5-HT_{2A} (3) y 5-HT₃ (4). Las primeras son interneuronas en cesto de tamaño medio y grande que expresan PV y CB y están especializadas en la inhibición perisomática de las neuronas piramidales. Las segundas son interneuronas pequeñas que expresan CB y CR y que preferentemente controlan las dendritas apicales de las neuronas piramidales.

La latencia de las excitaciones puras provocadas por la estimulación del NMR es menor a las del NDR. Esta diferencia podría explicarse por una velocidad de conducción distinta de los axones serotoninérgicos originados en uno u otro núcleo. En este sentido, los trabajos de Kosofsky y Molliver (1987) describen distintas morfologías de los axones serotoninérgicos, siendo los del NDR finos y con varicosidades pequeñas y los del NMR más gruesos y con varicosidades esféricas más prominentes. Además, la lesión selectiva de axones finos por derivados amfetamínicos muestra que ambos tipos de axones inervan los mismos territorios de la CPFm, lo que está en consonancia con nuestros resultados (O'Hearn *et al.*, 1988).

Por otra parte, la activación de receptores 5-HT_{2A} mediante la administración sistémica del agonista parcial 5-HT_{2A/2C} DOI aumenta la frecuencia de descarga de un 38 % de neuronas piramidales e inhibe a un 30 %. Sin embargo, el efecto neto sobre todas las neuronas registradas es un aumento de 2.4 veces la frecuencia de

descarga, debido a que el DOI induce un aumento muy marcado de la frecuencia de descarga piramidal. Este efecto excitatorio sobre la actividad cortical está en consonancia con la activación de la vía descendente excitadora a los NR descritos anteriormente. De este modo, la población de receptores 5-HT_{2A} en las neuronas piramidales es capaz de activar el circuito CPFm-NR.

La activación piramidal se produce, probablemente, por receptores 5-HT_{2A} localizados en la dendrita apical, mientras que las inhibiciones implicarían a una población cortical de interneuronas GABAérgicas que expresan el receptor 5-HT_{2A} (ver figura 16), ya que se bloquean con la aplicación del agonista del receptor GABA_A picrotoxinina. De hecho, se ha descrito la presencia del receptor 5-HT_{2A} en interneuronas GABAérgicas de tamaño grande y mediano, positivas para PV y CB y especializadas en la inhibición perisomática de las neuronas piramidales (Willins *et al.*, 1997; Jakab y Goldman-Rakic, 1998, 2000).

Presencia de respuestas mediadas por receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} en neuronas piramidales de corteza prefrontal medial

Existe una superposición en la distribución de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} en la corteza prefrontal a nivel de proteína y ARNm (Pazos y Palacios, 1985; Pazos *et al.*, 1985; Pompeiano *et al.*, 1992, 1994). De acuerdo con los resultados presentados en los Trabajos 2 y 4, existe una gran coexpresión de ambos receptores en la corteza. Aproximadamente el 50 % de las neuronas prefrontales coexpresan el ARNm de los dos receptores, de las cuales la mayor parte son neuronas piramidales (Trabajo 4; Santana *et al.*, 2004).

Las respuestas bifásicas registradas probablemente reflejan efectos opuestos en la excitabilidad de las neuronas piramidales que coexpresan los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A}, lo que se había propuesto con anterioridad (Araneda y Andrade, 1991; Ashby *et al.*, 1994). Otra evidencia del efecto dual de la 5-HT sobre la actividad piramidal es que el bloqueo de algunas inhibiciones por WAY 100635 desenmascara una excitación que, a su vez, bloqueamos con M100907. Probablemente estas neuronas se excitan e inhiben simultáneamente, aunque la respuesta inhibitoria predomina. Por otra parte, excitaciones 5-HT_{2A} e inhibiciones 5-HT_{1A} pueden alternarse en la misma neurona piramidal al estimular consecutivamente distintas

coordinadas de los NR. Además, aunque no encontramos diferencias en las proporciones de inhibiciones y respuestas excitadoras tras la estimulación del NDR (AP -7.8 mm) y el NMR, sí registramos más excitaciones ortodrómicas al estimular una coordenada más anterior dentro del NDR (-7.3 mm).

Dado que la 5-HT actúa de forma paracrina, estos resultados sugieren la existencia de distintas poblaciones de neuronas 5-HT en el NDR y NMR cuyos axones pasarían cerca de la dendrita apical o el cono axonal, generando respuestas opuestas en la misma neurona. Existen evidencias anatómicas de una localización diferencial de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} en la estructura de la neurona piramidal. Los receptores 5-HT_{2A} se sitúan en la dendrita apical (Jakab y Goldman-Rakic, 1998) modulando las entradas excitadoras mientras que los receptores 5-HT_{1A} se localizan en el soma o el cono axonal (Azmitia *et al.*, 1996; De Felipe *et al.*, 2001) controlando la generación del potencial de acción (Colbert y Johnston, 1996; ver figura 16). También se ha descrito la existencia de dos plexos muy densos de axones serotoninérgicos en las capas I y Va de la corteza somatosensorial, y entre ellos los axones serotoninérgicos se disponen verticalmente (Blue *et al.*, 1988), paralelos a las dendritas apicales enriquecidas en receptores 5-HT_{2A} (Jansson *et al.*, 2001). A su vez, axones serotoninérgicos pasan horizontalmente cerca del cono axonal de neuronas piramidales, áreas ricas en receptores 5-HT_{1A} y GABA_A (De Felipe *et al.*, 2001). Estos receptores GABA_A son los responsables de las sinapsis axo-axónicas que interneuronas en candelabro realizan sobre neuronas piramidales (sinapsis presentes exclusivamente en corteza cerebral; Somogyi *et al.*, 1998). Una localización análoga de los receptores 5-HT_{1A} podría explicar el potente papel inhibitorio que ejercen estos receptores sobre la generación del potencial de acción piramidal.

Por otra parte, dado que la 5-HT tiene mayor afinidad por el receptor 5-HT_{1A} que por el 5-HT_{2A} (Peroutka y Snyder, 1979; Hoyer *et al.*, 1985), podría suceder que estos últimos sólo se activaran en situación de gran liberación de 5-HT. En ese caso, una liberación elevada de 5-HT excitaría a un número mayor de neuronas piramidales. Sin embargo, los experimentos de estimulación sencilla (*single*) y en doblete (*twin*) del Trabajo 5 revelan que no parece ser este el mecanismo implicado. De hecho, la estimulación en doblete, que produce más liberación de 5-HT (Gartside *et al.*, 2000), induce más respuestas inhibitorias en las neuronas piramidales de

CPFm. Las inhibiciones aumentan su duración y su magnitud y la mayoría de excitaciones ortodrómicas disminuyen su concordancia o se convierten en inhibiciones.

Existen evidencias neuroquímicas del papel opuesto de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} en la CPFm (Trabajos 2 y 4). La activación del receptor 5-HT_{1A} cortical por agonistas selectivos revierte la liberación de 5-HT aumentada por la aplicación local de DOI y S-AMPA en corteza prefrontal, presumiblemente por la hiperpolarización piramidal que provoca su activación y la consiguiente reducción de la actividad del circuito CPFm-NR. Además, esta acción inhibitoria está exclusivamente mediada por los receptores 5-HT_{1A}, ya que su inactivación con toxina pertúsica o EEDQ, o la aplicación del antagonista WAY 100635 la revierten y está totalmente ausente en ratones mutantes nulos para este receptor.

Posible control GABAérgico de la corteza prefrontal medial por los núcleos del rafe

Las inhibiciones que aparecen en las neuronas piramidales tras la estimulación eléctrica sencilla o en doblete de los NR tienen un componente inicial insensible al antagonista 5-HT_{1A} WAY 100635. El bloqueo parcial por picrotoxinina sugiere la participación del GABA en este tipo de respuestas. Muy posiblemente existe liberación de GABA tras la activación de interneuronas que expresan los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT₃ (ver figura 16). Sin embargo, los resultados del Trabajo 5 inducen a considerar la existencia de una proyección GABAérgica desde el NDR y NMR a las porciones Cg1 y PL de la CPFm. La latencia de las inhibiciones es demasiado corta (~9 ms) para la velocidad de conducción de los axones serotoninérgicos e inferior a la latencia antidrómica de las neuronas piramidales, lo que no descarta que después del potencial de acción producido antidrómicamente exista una retroinhibición por la activación de una interneurona GABAérgica cortical. En la corteza MOs, que expresa receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} en la misma proporción que la CPFm pero no proyecta a los NR, las inhibiciones que registramos tienen una latencia mayor (20 ms) y son más sensibles a WAY 100635. Estos resultados atribuyen un papel más destacado al componente inhibitorio 5-HT_{1A} y sugieren que las neuronas de la corteza MOs no reciben aferencias GABAérgicas desde los NR.

La proyección GABAérgica desde los NR a la CPFm sería similar a la identificada para el ATV, que induce inhibiciones en las neuronas piramidales con una latencia prácticamente idéntica a la que nosotros registramos tras la estimulación de los NR (Carr y Sesack, 2000a). Además, está descrito que una tercera parte de los axones que proyectan desde los NR a la corteza (un 20% del NDR y un 40% del NMR) no son serotoninérgicos (O'Hearn y Molliver, 1984; Kosofsky y Molliver, 1987). Posteriormente se han descrito morfológicamente (Li *et al.*, 2001) y, parte de ellos, se han caracterizado como GABAérgicos (Jankowski y Sesack, 2002). Así pues, parece que no sólo los receptores 5-HT_{1A} sino también los GABA_A serían los responsables de las respuestas inhibitorias inducidas en las neuronas piramidales tras la estimulación eléctrica de los NR.

Control de la actividad de interneuronas GABAérgicas de corteza prefrontal medial por receptores 5-HT₃

Estudios *in vivo* muestran que el receptor 5-HT₃ participa en los efectos inhibitorios de la 5-HT sobre la actividad de las neuronas piramidales de la CPF (Ashby *et al.*, 1989, 1991, 1992). Asimismo, trabajos *in vitro* detectan la presencia de corrientes excitadoras 5-HT₃ de elevada amplitud y desensibilización rápida en interneuronas GABAérgicas (Zhou y Hablitz, 1999; Férézou *et al.*, 2002). Sin embargo, no se habían descrito estas corrientes excitadoras en interneuronas GABAérgicas *in vivo*.

Algunas neuronas prefrontales de capas superficiales que descargan espontáneamente de forma lenta responden a la 5-HT endógena con excitaciones ortodrómicas tras estimular eléctricamente los NR. Dado que estas activaciones tienen una latencia y duración inferiores y una concordancia superior a las excitaciones ortodrómicas 5-HT_{2A} y se bloquean con los antagonistas selectivos del receptor 5-HT₃ ondansetron y tropisetron, inferimos que están mediadas por el receptor 5-HT₃. Las diferencias en latencia y duración tras la activación de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT₃ sugiere que existe un patrón temporal que puede ser esencial en la activación cortical y en la sincronización de los distintos microcircuitos de la CPF. Las características de las excitaciones 5-HT₃ concuerdan con una corriente producida por un canal iónico (Maricq *et al.*, 1991; Férézou *et al.*, 2002) y

son similares a datos obtenidos en hipocampo (Ropert y Guy, 1991; Kawa, 1994; McMahon y Kauer, 1997).

Los receptores 5-HT₃ se expresan en corteza de rata y prácticamente todas las neuronas que lo expresan (> 90 %) son interneuronas GABAérgicas (Morales *et al.*, 1996; Morales y Bloom, 1997). Se trata de interneuronas positivas para CB, CR y CCK, que controlan preferentemente las dendritas de las neuronas piramidales (Morales y Bloom, 1997; Jakab y Goldman-Rakic, 2000; ver figura 16). Un estudio más detallado de la distribución de los receptores 5-HT₃ en la CPFm confirma que la mayoría de neuronas que lo expresan son GABAérgicas y una pequeña proporción (< 5%) son glutamatérgicas (Trabajo 6). Además, representan aproximadamente el 20 % de todas las neuronas GABAérgicas en cada una de las áreas de la CPFm (Cg, PL e IL), aunque existe un gradiente descendente desde capa I a VI. Esta localización característica sugiere que los receptores 5-HT₃ son la diana del denso plexo de terminales 5-HT que llegan a las capas superficiales de la corteza (Blue *et al.*, 1988) y, posiblemente, están modulando la actividad piramidal a través de sus contactos con las dendritas apicales.

5.4. Consideraciones finales

En la presente Tesis hemos caracterizado el circuito existente entre la corteza prefrontal medial y los núcleos del rafe, dejando constancia de la importante interacción anatómica y funcional entre estas dos áreas cerebrales. Hemos determinado los mecanismos corticales que controlan la actividad serotoninérgica y la modulación que ejerce la serotonina en la actividad cortical. Además, hemos detallado las características electrofisiológicas de la activación de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} en neuronas corticales de proyección y su implicación en la fisiología de dicho circuito. También hemos estudiado la activación de receptores 5-HT₃ en interneuronas GABAérgicas de la corteza prefrontal medial. Todos estos resultados ayudan a comprender el funcionamiento de la corteza prefrontal y, en particular, a mejorar el conocimiento del papel de la serotonina en la función cerebral.