



**Università degli Studi di Cagliari**

**DOTTORATO DI RICERCA IN INGEGNERIA BIOMEDICA**

Ciclo XXVIII

**PREPULSE INHIBITION COME STRUMENTO DIAGNOSTICO  
PER LO STUDIO DEL COMPORTAMENTO  
IMPULSIVO-AGGRESSIVO NELLA SCHIZOFRENIA**

Settore/i scientifico disciplinari di afferenza

ING-IND/34 – Bioingegneria Industriale

Presentata da:	Alessandra Pardu
Coordinatore Dottorato	Prof. Giacomo Cao
Tutor	Dott.ssa Paola Devoto

Esame finale anno accademico 2014 – 2015

Sommario

## Indice

<i>Premessa</i> .....	1
1 INTRODUZIONE.....	2
1.1 NEUROBIOLOGIA DELLA SCHIZOFRENIA .....	2
1.2 TERAPIA DELLA SCHIZOFRENIA.....	4
1.3 AGGRESSIVITÀ IN SCHIZOFRENIA .....	5
1.4 VALIDITÀ DI UN MODELLO ANIMALE IN PSICHIATRIA .....	7
1.5 FENOTIPI INTERMEDI ED ENDOFENOTIPI.....	10
1.6 PREPULSE INHIBITION DEL RIFLESSO DI STARTLE (PPI) .....	10
1.7 VALIDITÀ PREDITTIVA DELLA PPI: MODELLI FARMACOLOGICI.....	14
1.8 VALIDITÀ PREDITTIVA DELLA PPI: MODELLI AMBIENTALI .....	15
2 SCOPO DEL LAVORO .....	19
Prima parte.....	20
3 METODI.....	21
3.1 ANIMALI .....	21
3.2 APPARATI E PROCEDURE SPERIMENTALI .....	21
3.2.1 Startle Reflex System.....	21
3.2.2 Configurazione e protocollo sperimentale.....	22
3.2.3 Identificazione della risposta di startle .....	28
3.2.4 Campionamento dei dati.....	29
3.2.5 Razionale e disegno sperimentale I.....	30

3.2.6 Farmaci I .....	32
3.2.7 Razionale e disegno sperimentale II.....	32
3.2.8 Farmaci II .....	33
3.2.9 Analisi dei dati .....	33
4 RISULTATI.....	35
4.1 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEGLI AGONISTI RECETTORIALI $D_1$ NEI RATTI SPRAGUE- DAWLEY, WISTAR E LONG-EVANS .....	35
4.2 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEGLI AGONISTI RECETTORIALI $D_2$ NEI RATTI SPRAGUE- DAWLEY E LONG-EVANS.....	40
4.3 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DELL'APOMORFINA NEI RATTI SPRAGUE-DAWLEY, WISTAR E LONG-EVANS.....	41
4.4 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEL <i>rac</i> -BHFF NEI RATTI SPRAGUE-DAWLEY .....	42
4.5 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEL <i>rac</i> -BHFF NEI TOPI C57BL/6J.....	44
4.6 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEL <i>rac</i> -BHFF NEI TOPI DBA/2J.....	45
5 DISCUSSIONE .....	47
Seconda parte.....	52
6 METODI.....	54
6.1 ANIMALI.....	54
6.2 APPARATI E PROCEDURE SPERIMENTALI .....	54
6.2.1 Maternal separation.....	55
6.2.2 Resident-intruder .....	56
6.2.3 Farmaci .....	56
7 RISULTATI.....	57
7.1 EFFETTO DELLA DIZOCILPINA SUI PARAMETRI DI STARTLE E PPI.....	57

7.2 EFFETTO DELLA MS SUI TOPI WT E MAO-A <sup>Neo</sup> .....	58
8 DISCUSSIONE .....	60
9 CONCLUSIONI .....	64
10 BIBLIOGRAFIA .....	66

## *Premessa*

La schizofrenia è un disturbo invalidante del neurosviluppo, a carattere multifattoriale, attribuito all'interazione di componenti organiche, genetiche e ambientali. La terapia corrente è basata su interventi farmacologici, con risultati variabili o poco soddisfacenti, e circa il 30 % dei pazienti non risponde al trattamento farmacologico. L'approccio terapeutico e la diagnosi sono resi difficoltosi anche dalla grande varietà di sintomi che caratterizza il cosiddetto "disturbo dello spettro schizofrenico". In questo contesto, assume particolare importanza la diagnosi precoce della schizofrenia paranoide, soprattutto quando accompagnata da comportamento aggressivo e disturbi nel controllo dell'impulso. Infatti, in questo sottotipo schizofrenico, si verificano frequenti episodi di violenza sia nelle fasi acute che croniche della malattia, che in alcuni casi, sfociano in vere e proprie aggressioni e omicidi, con gravi conseguenze anche per i familiari e addetti sanitari. I disturbi dell'impulsività e i comportamenti aggressivi che contraddistinguono questi pazienti sembrano essere scatenati ed esacerbati da eventi stressanti e correlati all'incapacità di rapportarsi con l'ambiente circostante e di elaborare la miriade di informazioni sensoriali provenienti dall'esterno. Questo fondamentale meccanismo di filtraggio delle informazioni è regolato da un circuito neurobiologico chiamato "sensorimotor gating" o "cancello sensorimotorio", che permette di valutare ciò che è saliente e fondamentale per la sopravvivenza da ciò che è irrilevante e nocivo per l'individuo. Il funzionamento di questo circuito assume particolare importanza in clinica, in quanto può essere misurato sperimentalmente attraverso un test diagnostico chiamato "pre-pulse inhibition (PPI)", ed è deficitario in pazienti affetti da diverse patologie psichiatriche, inclusa la schizofrenia. L'importanza della PPI risiede anche nel fatto che può essere misurata in tutta la scala animale, compresi i roditori.

# 1 INTRODUZIONE

## 1.1 NEUROBIOLOGIA DELLA SCHIZOFRENIA

La schizofrenia è una patologia a carattere evolutivo che comprende un ampio spettro di manifestazioni cognitive ed emotive, caratterizzata da un rapido deterioramento della sfera percettiva e relazionale del soggetto. La prevalenza di questa malattia è piuttosto rilevante, essendo compresa tra lo 0,5 e l'1 % della popolazione. Inoltre, l'impatto sociale della patologia è notevole, dato che l'età di esordio è generalmente compresa tra l'adolescenza e la prima giovinezza. Dopo una fase prodromica, in cui si assiste a un progressivo appiattimento dell'attività sociale e delle proprietà cognitive dell'individuo, il decorso clinico di questa malattia prevede uno stadio attivo, in cui la sintomatologia della schizofrenia raggiunge il suo acme clinico. I sintomi della schizofrenia vengono classificati in:

- positivi, che comportano la produzione di manifestazioni percettive floride e incoerenti come allucinazioni, deliri, comportamento bizzarro;
- negativi, descritti come una rarefazione della sfera emotiva, cognitiva e comportamentale e caratterizzata da appiattimento affettivo, alogia, apatia, asocialità, anedonia e compromissione dell'attenzione e della gestualità.

Tra i sistemi neurotrasmettitoriali principalmente implicati nella neurobiologia delle manifestazioni psicotiche, quello dopaminergico riveste un ruolo di primaria importanza.

La prima osservazione riguardante una stretta correlazione tra dopamina e schizofrenia risale al 1963, quando Carlsson e Lindquist osservarono che il turnover della dopamina era aumentato negli animali di laboratorio cui erano stati somministrati farmaci antipsicotici. Successivamente, l'efficacia clinica di questi farmaci fu correlata con la loro affinità per i siti recettoriali per la dopamina (Creese, 1976; Seeman, 1976).

Nel 1979, Keabian e Calne furono in grado di differenziare due distinte classi di recettori dopaminergici:

- i recettori D<sub>1</sub>, associati positivamente all'adenilato-ciclasasi;

- i recettori D<sub>2</sub>, associati a una inibizione dell'adenilato ciclasi.

Proprio i recettori D<sub>2</sub> apparvero essere costantemente antagonizzati dai farmaci antipsicotici. Questo dato, insieme all'osservazione della comparsa di sintomi psicotici in pazienti trattati con farmaci come amfetamina o L-DOPA (Angrist, 1973), portò alla formulazione della cosiddetta "ipotesi dopaminergica" della schizofrenia, secondo la quale i sintomi positivi sarebbero causati da una iperattività dopaminergica del sistema mesolimbico. Infatti, l'induzione farmacologica dell'iperattività dopaminergica negli animali di laboratorio produce delle alterazioni comportamentali alquanto simili ai sintomi positivi della schizofrenia (Braff, 1990; Mathysse, 1977). Inoltre, è stato riscontrato un aumento della concentrazione di dopamina a livello del nucleo accumbens, della sostanza reticolare anteriore (Bird, 1979), del nucleo caudato (Crow, 1979) e dell'amigdala di pazienti schizofrenici (Reynolds, 1983).

Al contrario, alla base dei sintomi negativi vi sarebbe una riduzione dell'attività dopaminergica a livello mesocorticale prefrontale. A riprova di questa ipotesi, diversi studi condotti su modelli animali hanno dimostrato che lesioni a carico della corteccia prefrontale mediale producono un incremento evidente dell'iperattività comportamentale e biochimica della dopamina nei gangli della base. Ulteriori studi sulla differenziazione dei recettori dopaminergici, nonché sul ruolo di altri neurotrasmettitori nelle patologie psichiatriche, hanno però reso l'ipotesi dopaminergica sempre più inadeguata a spiegare *in toto* la neurobiologia del disturbo. Infatti, anche un'anormale trasmissione glutammatergica viene presa in considerazione come possibile concausa della schizofrenia.

Nei modelli animali, la distruzione delle fibre corticali glutammatergiche aumenta la suscettibilità dell'animale agli effetti indotti dagli agonisti dopaminergici (Scatton, 1982). Inoltre la fenciclidina (PCP), antagonista non-competitivo del recettore NMDA è in grado di indurre tipicamente una sintomatologia simil-psicotica nell'uomo (Steinpreis, 1996). Infine, nel tentativo di risolvere la complessità biologica della schizofrenia, è stata presa in considerazione l'interazione fra le proiezioni serotoninergiche e quelle dopaminergiche frontali.

Le prime teorie che implicarono il sistema serotoninergico nella patogenesi della schizofrenia erano basate su osservazioni che l'LSD, un agonista per i recettori serotoninergici 5-HT<sub>2</sub>,

poteva produrre uno stato psicotico. Inoltre, diversi autori hanno evidenziato una stretta modulazione dell'attività dopaminergica da parte della serotonina (Dickinson, 1983; Korsgaard, 1985).

L'osservazione che alcuni neurolettici atipici (clozapina, risperidone) possiedono attività serotonino-antagoniste (Bleich, 1988), ha recentemente ridestato l'interesse verso il sistema serotoninergico. L'interazione fra sistema serotoninergico e dopaminergico potrebbe spiegare i sintomi in funzione del rapporto tra i due sistemi: i sintomi positivi potrebbero essere correlati all'iperattività dopaminergica e all'ipoattività serotoninergica, mentre i sintomi negativi si assocerebbero ad un aumento dell'attività serotoninergica e ad una diminuzione di quella dopaminergica.

## **1.2 TERAPIA DELLA SCHIZOFRENIA**

Al momento attuale, la terapia farmacologica per il trattamento della schizofrenia si basa su diverse categorie di composti, tutti accomunati dalla capacità di antagonizzare con efficacia variabile i recettori D<sub>2</sub>.

Questi farmaci, detti antipsicotici, o secondo la nomenclatura tradizionale, neurolettici, agiscono su numerosi altri recettori. Il particolare spettro d'affinità di ogni singolo farmaco per i diversi recettori ne condiziona gli effetti clinici. Infatti, i farmaci antipsicotici agiscono tipicamente anche sui recettori  $\alpha$ -adrenergici centrali e periferici, sui recettori istaminergici e su quelli serotoninergici.

Un diffuso criterio clinico e farmacologico classifica i farmaci antipsicotici in due distinte categorie:

- composti tipici o tradizionali, come le fenotiazine e l'aloiperidolo;
- composti atipici o di nuova generazione, come la clozapina e il risperidone.

A differenza dei composti tradizionali, i composti atipici presentano il caratteristico vantaggio clinico di non indurre l'insorgenza di effetti secondari di natura extrapiramidale. Questi ultimi sono caratterizzati da un aspetto clinicamente simile ai fenomeni motori che contraddistinguono il morbo di Parkinson, come tremori, rigidità, movimenti rallentati e



irrequietezza. Inoltre, i composti atipici sono riconosciuti più efficaci nel trattamento dei sintomi negativi e delle forme di psicosi resistenti al trattamento con i farmaci tradizionali.

I farmaci antipsicotici più utilizzati sono le fenotiazine, il cui capostipite è la clorpromazina; oltre a bloccare i recettori D<sub>2</sub>, questi composti antagonizzano anche i recettori colinergici, serotoninergici, istaminergici e noradrenergici. L'inattivazione di questi recettori comporta un'ampia gamma di effetti collaterali tra i quali: secchezza di fauci, midriasi, stitichezza, ritenzione urinaria e tachicardia, sedazione e ipotensione. L'aloiperidolo, rappresentante tipico della categoria dei butirrofenoni, esplica un'azione farmacologica del tutto simile a quella delle fenotiazine, rispetto alle quali tuttavia, dimostra di produrre un numero notevolmente inferiore di effetti indesiderati, pur causando effetti extrapiramidali di uguale o maggiore intensità rispetto alla clorpromazina.

In generale, comunque, l'aloiperidolo costituisce una valida alternativa per i pazienti che non rispondono alla terapia con le fenotiazine.

La clozapina è un farmaco antipsicotico che si è rivelato utile nel trattamento dei pazienti schizofrenici resistenti alla terapia con composti tipici; questo composto è in grado di attenuare molti sintomi negativi della schizofrenia ed è privo degli effetti collaterali extrapiramidali associati ai neurolettici tradizionali. Il meccanismo d'azione antipsicotico della clozapina potrebbe essere legato alla sua affinità verso i recettori D<sub>4</sub>, 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>1C</sub>. Gli effetti collaterali più comuni della clozapina includono sedazione e sporadica comparsa di agranulocitosi.

### **1.3 AGGRESSIVITÀ IN SCHIZOFRENIA**

Sebbene la maggior parte degli individui con disturbi neuropsichiatrici, quali la schizofrenia, non manifesti comportamenti aggressivi, un piccolo sottogruppo manifesta una condotta violenta con un'incidenza più alta rispetto ai membri della popolazione generale, rientrando nella classificazione del DSM-V dello schizotipo aggressivo.

L'incapacità umana di mettere a freno il comportamento aggressivo e la violenza ha un impatto pesantissimo sulla società: si stima che circa 4400 persone muoiano ogni giorno nel

mondo per aggressioni subite, molte altre rimangono ferite, altre ancora soffrono per conseguenze non fatali per essere state vittime o testimoni di comportamenti violenti. La prevalenza del comportamento aggressivo umano è sufficiente per costituirne un problema socioeconomico mondiale e di pubblica salute (Krug, 2002).

Gli atti violenti che si verificano all'interno della nostra società vengono attribuiti solo per il 5 % ai disturbi aggressivi della personalità associati alla schizofrenia e ad altre malattie mentali; questi episodi, che sarebbero la causa del 6-28 % delle aggressioni, possono essere prevenuti con la terapia farmacologica (Victoroff, 2014).

Il comportamento violento nelle persone schizofreniche è legato a complicanze dovute alla terapia farmacologica, che nella maggior parte dei casi consiste nel trattamento con alte dosi di neurolettici per lunghi periodi, e alla assenza di *compliance* del paziente. Inoltre, le manifestazioni comportamentali aggressive sono correlate ad altri fattori, inclusi quelli di natura ambientale come eventi traumatizzanti in età infantile (stress psicosociale, maltrattamenti, abbandono), abuso di sostanze stupefacenti, ecc. (Buckley, 2011; Szeszko, 2015).

Molti autori concordano sul fatto che gli antipsicotici atipici, preferibilmente la clozapina, dovrebbero rappresentare la terapia d'elezione per il trattamento dell'aggressività nel disturbo dello spettro schizofrenico. Essi, altresì, rivendicano il bisogno di rifinire la terapia stessa alla luce dei nuovi studi effettuati sulla malattia. In una recente meta-analisi, i ricercatori hanno esaminato 45.533 individui con disturbi psichiatrici di cui 8.439 (il 18,5 %) riconosciuti come violenti e per i quali l'impulsività è stata identificata come uno dei fattori di rischio che aumenta la probabilità di sviluppare lo schizotipo aggressivo (Witt, 2013). Per descrivere questo particolare aspetto comportamentale dello spettro schizofrenico, è stato introdotto il costrutto di "*urgency*", che riflette "l'impulsività in un contesto di forte emozione" e si riferisce "all'agire in modo avventato durante esperienze fortemente emotive".

Tra le funzioni cerebrali che vengono perse o peggiorate nella schizofrenia, le abilità esecutive sono quelle maggiormente compromesse, come evidenziato dal "*response inhibition task*". Questo test permette di esprimere una valutazione del comportamento

impulsivo misurando sia la velocità del processo comportamentale inibitorio sia l'abilità di intraprendere questa azione. Mentre la velocità è invariata, l'atto inibitorio risulta diminuito negli individui schizofrenici. In linea con l'ipotesi di una disfunzione del controllo inibitorio alla base dell'insorgenza dello schizotipo aggressivo, le regioni frontali corticali riconosciute come substrati fisiopatologici della schizofrenia sono anche quelle tipicamente implicate nella *response inhibition* (Enticott, 2008; Kaladjian, 2011; Hoptman, 2015). Inoltre, è stato visto che le aree cerebrali coinvolte nelle regolazioni neurocognitive e in particolare nella regolazione del controllo dell'impulsività, ovvero la corteccia prefrontale mediale e laterale, risultano isolate dalle regioni subcorticali negli individui sani che mostrano alta impulsività comportamentale. Al contrario queste stesse regioni, nelle persone meno impulsive, risultano ben collegate, come a formare un *cluster*. Comunque, i *pathways* coinvolti potrebbero differire tra individui sani e schizofrenici, anche se in questi ultimi si è riscontrata una disfunzione nel circuito frontale-temporale- limbico (Enticott, 2008).

#### **1.4 VALIDITÀ DI UN MODELLO ANIMALE IN PSICHIATRIA**

I modelli animali forniscono un potente strumento per lo studio dei substrati biologici che sono alla base dei disturbi psichiatrici all'interno di uno standardizzato *setting* sperimentale. Il miglior target animale per indirizzare delle ipotesi patofisiologiche di una malattia mentale è tuttora fornito dai roditori, in virtù del loro relativo grado di continuità anatomica e filogenetica con l'uomo e dei vantaggi che essi possiedono rispetto allo studio sui primati, tra cui: piccole dimensioni, breve periodo riproduttivo, costi contenuti. Nonostante l'ovvio gap esistente tra roditori e uomo, la validità traslazionale di questi modelli è comunque garantita da comuni tratti fisiologici, neurobiologici e da sostanziali caratteristiche etologiche. Pertanto, le osservazioni sperimentali su topi (*Mus musculus*) e ratti (*Rattus norvegicus*) di laboratorio sono divenute negli anni una fonte di informazioni fondamentali per la conoscenza di substrati neurali e molecolari che sottendono l'organizzazione comportamentale in tutte le sue forme e complessità.

I primi modelli animali finalizzati allo studio delle malattie psichiatriche sono stati per lo più sviluppati per la scoperta di nuovi agenti terapeutici. La maggior parte di questi modelli cercava di rispecchiare alcune sintomatologie psichiatriche, come ad esempio, fenotipi comportamentali alterati dopo somministrazione di farmaci psicotropi in pazienti sani. Per esempio, le azioni del composto psicotomimetico amfetamina e del simpaticolitico reserpina hanno fornito un razionale importante per collegare le manifestazioni comportamentali indotte da questi agenti come rappresentazioni sperimentali di schizofrenia e depressione, rispettivamente.

Sebbene gli *outcomes* comportamentali di questi modelli di correlazione fossero spesso marcatamente differenti dai reali sintomi di queste patologie, il loro studio ha fornito un effettivo beneficio per valutazioni sperimentali di nuove molecole con potenzialità terapeutica.

Nonostante questo vantaggio, la scarsa rilevanza patofisiologica di questi modelli ha ristretto la loro validità, ma ha aperto la strada per lo sviluppo dei cosiddetti “modelli omologhi”, indirizzati nel riprodurre, per quanto possibile, tutte le caratteristiche insite nei disturbi psichiatrici, inclusa eziologia, patofisiologia, presentazione dei sintomi e responsività ai trattamenti farmacologici. Nello specifico, il grado di isomorfismo tra il modello e la patologia è stato classificato nel 1986 da Willner secondo tre criteri di validità (Willner, 1986):

- *face validity*, che descrive le analogie tra le manifestazioni comportamentali del modello animale ed i segni e sintomi del disturbo psichiatrico;
- *construct validity*, basato sulla congruenza dei processi etologici e patofisiologici;
- *predictive validity*, che significa la responsività del modello ai trattamenti efficaci utilizzati in terapia.

La stretta adesione a questi principi ha portato inizialmente ad un diverso approccio sistematico e ad uno sviluppo di nuovi modelli mirati a riprodurre un largo spettro di manifestazioni di una data patologia. Nonostante il rispetto di questi criteri di validità assicurino un’alta sensibilità e specificità dei risultati ottenuti con il modello animale, i ricercatori dovrebbero essere molto cauti nel loro utilizzo. Ad esempio, una eccessiva enfasi nella *face validity*, potrebbe portare ad un *bias* antropomorfo e ad altri errori interpretativi.

Allo stesso modo, una sovrastima nell'uso di un composto di riferimento per la validità predittiva di uno studio (controllo positivo), potrebbe impoverire la traslationalità potenziale del modello (Belzung, 2001).

Queste premesse, insieme alla generale mancanza di nuove terapie farmacologiche per il trattamento dei disturbi psichiatrici, hanno spesso portato diversi autori a sopravvalutare il valore dei modelli animali (Knight, 2007). Inoltre, cercare di riprodurre un modello animale in psichiatria, pone ulteriori complicazioni, basate sull'assenza di specifici ed indistinguibili *biomarkers* o indici quantitativi misurabili nei correnti criteri di valutazione classificati nel manuale diagnostico dei disturbi psichiatrici (DSM V, 2013). Per esempio, i criteri per la classificazione nosologica della schizofrenia si avvalgono di segni diagnostici e sintomatici ancora limitati, che possono essere attribuiti ad un numero di differenti patologie psichiatriche e confusi o sovrapposti nell'analisi semeiotica di una malattia; viceversa, caratteristiche con eziologia e patofisiologia simile potrebbero essere erroneamente allontanate da criteri diagnostici troppo "schematici". La consapevolezza di questo scenario ha alimentato un vivo dibattito accademico sulla riorganizzazione dei valori traslazionali in psichiatria, e reiterato la necessità di incorporare nuovi criteri patofisiologici nella classificazione dei disturbi mentali (Markou, 2009). Una delle più proficue conclusioni di queste discussioni è stato l'implementazione quantitativa, patofisiologica e dimensionale nei nuovi concetti guida per la nuova edizione del DSM (DSM-V) (Hyman, 2007; Lecrubier, 2008; Phillips, 2006). La fusione di questi principi con i correnti standard diagnostici porterà ad ampliare il potere traslazionale dei risultati provenienti dai modelli animali e a supportare l'identificazione di nuovi *markers* biologici che sottendono specifici fenotipi.

## 1.5 FENOTIPI INTERMEDI ED ENDOFENOTIPI

Un altro importante corollario nella riorganizzazione teorica e traslazionale nella classificazione delle patologie psichiatriche è stato lo sviluppo del concetto di “fenotipo intermedio”. Con questo termine si intende una caratteristica quantificabile sia essa rappresentata a livello neuroanatomico, neurofisiologico, neuropsicologico o cognitivo ma che rifletta più semplicemente l'intera costellazione di alterazioni presenti in una categoria diagnostica (Leboyer, 1998).

Un importante variante di questa nozione è quella degli “endofenotipi”, definiti come un fenotipo intermedio che, sebbene non necessariamente patologico, può essere un elemento di vulnerabilità di un disturbo mentale (Gottesman, 2013; Gould, 1993; 2006; 2007).

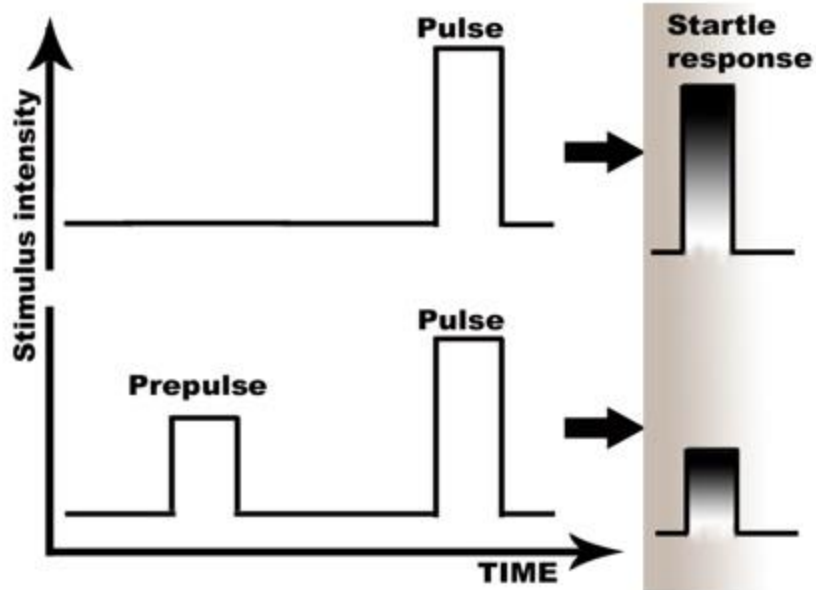
La validità di una caratteristica biologica di un dato endofenotipo è dettata da un set di criteri che riflettono ed enfatizzano la sua natura genetica (Arts, 2008; Gould, 2006; Viswanath, 2009):

- l'endofenotipo è ereditabile;
- all'interno di una famiglia, l'endofenotipo e la malattia co-segregano;
- l'endofenotipo che si riscontra nei membri affetti di una famiglia è più frequente nei membri non affetti che nella popolazione generale.

Sebbene le manifestazioni di alcuni endofenotipi possano presentarsi solo in corrispondenza di specifiche contingenze ambientali (interazioni gene-ambiente), esse sono sempre attive e indipendenti dalle fluttuazioni sintomatiche del disturbo associato.

## 1.6 PREPULSE INHIBITION DEL RIFLESSO DI STARTLE (PPI)

A livello neurofisiologico, l'endofenotipo più rappresentativo e studiato nella schizofrenia e in altre patologie psichiatriche è fornito dalla *prepulse inhibition* del riflesso di *startle* (PPI). La PPI è la riduzione della risposta motoria evocata da un forte stimolo sensoriale che si verifica quando quest'ultimo è preceduto da uno stimolo di intensità inferiore (Hoffman, 1980) (Fig. 1).



**Fig. 1** Rappresentazione grafica di una risposta motoria (*startle*) ad uno stimolo sonoro di forte intensità (*pulse*). Lo stesso stimolo, se immediatamente preceduto (nell'ordine dei millisecondi) da un prestimolo di intensità inferiore (*prepulse*), evoca una risposta inferiore.

Questo riflesso può essere definito come il risultato di un insieme di risposte a uno stimolo improvviso e relativamente intenso, che si manifesta con una contrazione dei muscoli scheletrici e facciali e che è generalmente classificato come una reazione di difesa. In pratica, il grado con il quale la *prepulse* inibisce la risposta motoria riflessa al successivo intenso evento sensorio (stimolo di *startle*) costituisce una tra le più semplici misure operative di inibizione sensori-motoria (Abbruzzese, 2003). Tale forma di inibizione rappresenterebbe il meccanismo attraverso il quale stimoli in eccesso, o privi d'importanza, vengono vagliati o "estromessi" dalla coscienza, affinché il soggetto possa focalizzare l'attenzione sugli aspetti più salienti di cui è caricato lo stimolo. Il debole prestimolo, dunque, attiverrebbe una serie di processi centrali che inizialmente incrementano e poi smorzano la responsività agli eventi sensoriali durante una breve finestra temporale successiva. Tale periodo di "*gating*" è stato empiricamente calcolato pari a 30-500 ms, sia nel ratto che nell'uomo (Kumari, 2002). Questo periodo di ridotta responsività potrebbe servire transitoriamente a proteggere l'informazione contenuta nel debole stimolo iniziale affinché possa adeguatamente essere elaborata senza l'interferenza di stimoli successivi più forti.

Il riflesso inibitorio può essere evocato quando la *prepulse* e lo stimolo di *startle* sono presentati sia nella stessa che in una diversa modalità sensoriale (acustica, tattile, visiva). Il fenomeno non costituisce una forma di condizionamento, poiché si manifesta sin dalla prima esposizione agli stimoli, e non presenta assuefazione nel corso di sessioni di test successive. L'informazione contenuta nello stimolo sarebbe elaborata attraverso una sequenza di passaggi o fasi successive.

A livello neurobiologico, l'effetto inibitorio della *prepulse* alla reazione di *startle*, avrebbe luogo all'interno del ponte, ma sarebbe regolato da connessioni con le vie limbiche discendenti cortico-striato-pallido-pontina e cortico-striato-pallido-talamica, che ne modulerebbero il tono. Sostanzialmente, l'influenza di tali vie, determinerebbe il grado di inibizione nei confronti della successiva risposta motoria (Swerdlow, 2000). La PPI in definitiva rifletterebbe l'attivazione di processi comportamentali, regolati dai circuiti neuronali del cervello anteriore. Più nel dettaglio, come è emerso da studi di mappaggio sull'animale di laboratorio, sono stati identificati due circuiti principalmente implicati nei paradigmi della PPI:

- un circuito intrinseco o primario che comprende, oltre ai collicoli superiore e inferiore, il nucleo peduncolo-pontino, il nucleo latero-dorsale e il nucleo reticolare pontino caudale;
- un più complesso circuito estrinseco, che coinvolge numerose aree, prevalentemente collocate nel sistema mesolimbico.

Quest'ultimo comprende, tra l'altro, l'area tegmentale-ventrale, l'amigdala baso-laterale, l'ippocampo ventrale, i nuclei dorso-mediali del talamo e soprattutto il nucleo accumbens. Quest'ultima area sarebbe direttamente implicata nel controllo diretto del riflesso di *startle* a livello del nucleo peduncolo-pontino e del nucleo latero-dorsale.

Nell'uomo, il riflesso di *startle* è misurato con un esame elettromiografico dei muscoli orbicolari dell'occhio (*eye blink*), mentre nei roditori si utilizza una camera stabilimetrica per misurare sussulti indotti dallo stimolo di *startle*.

L'interesse nella PPI come misura del *sensorimotor gating* è stimolato dall'osservazione che le disfunzioni nei substrati cerebrali che regolano la PPI sono accompagnate in modo



evidente da una menomazione della sfera cognitiva o percettivo-sensoriale (Phillips, 2003). In pratica, dalla patologica interruzione nella finestra di *gating*, ci si deve attendere un deterioramento dell'elaborazione ordinata e strutturalmente gerarchizzata dell'informazione sensoriale.

Validi contributi alla comprensione dei substrati neurobiologici di questo tipo di disturbi, provengono, ovviamente, dagli studi sui modelli animali di schizofrenia. Negli animali di laboratorio, esistono almeno 3 distinti modelli farmacologici di alterazione della PPI (*disruption*) relativi alla schizofrenia, ottenuti somministrando:

- agonisti dopaminergici (apomorfina e amfetamina);
- agonisti serotoninergici (LSD e DOI);
- antagonisti irreversibili del recettore NMDA (dizocilpina, fenciclidina e ketamina).

Oltre a queste disfunzioni del *sensorimotor gating* basate sull'utilizzo di manipolazioni farmacologiche, sono stati recentemente individuati nuovi modelli animali che simulano aspetti fisiopatologici di questi disturbi in maniera più naturalistica.

In particolare, l'isolamento sociale e la prolungata deprivazione di sonno REM inducono nei roditori una sequela di modificazioni neurochimiche, molecolari e comportamentali riconducibili a disfunzioni riscontrabili nei pazienti schizofrenici. Per esempio, ratti allevati in isolamento immediatamente dopo lo svezzamento sviluppano alterazioni comportamentali permanenti misurabili nell'età adulta, quali: deficit nella PPI, neofobia, aggressività, rigidità comportamentale e suscettibilità ai farmaci psicotomimetici. In aggiunta, è stato chiaramente dimostrato che queste modificazioni comportamentali sono associate ad alterazioni del segnale dopaminergico mesolimbico, aumento dei recettori presinaptici dopaminergici e serotoninergici nel nucleus accumbens, ipofrontalità corticale e ridotta plasticità sinaptica nell'ippocampo (Fone, 2008).

Allo stesso modo, i ratti al termine di 72 ore di deprivazione di sonno REM, non entrano immediatamente nella fase di sonno, ma rimangono in uno stato di veglia di circa 30 minuti, durante il quale mostrano una spettro di anomalie comportamentali riconducibili a quelli presenti nei disturbi psicotici e maniacali (Gessa, 1995).

In particolare, gli animali privati di sonno REM mostrano iperattività, irritabilità, aggressività spontanea e comportamenti stereotipati. In linea con il modello dell'isolamento, queste modificazioni comportamentali sono state correlate a disfunzioni del sistema dopaminergico in termini di "up-regulation" dei recettori D<sub>2</sub> (Nunes, 2007), e aumentata sensibilità agli effetti di agenti dopamino-mimetici diretti (apomorfina) ed indiretti (cocaina e amfetamina) (Andersen, 2009). Queste evidenze sono in accordo con diversi studi clinici che hanno evidenziato come la deprivazione prolungata di sonno REM, può indurre nell'uomo profonde modificazioni cerebrali che favoriscono la comparsa di alterazioni della percezione sensoriale, stati allucinatori e crisi pseudomaniacali (Howland, 1997).

### **1.7 VALIDITÀ PREDITTIVA DELLA PPI: MODELLI FARMACOLOGICI**

Uno degli aspetti più importanti del modello di PPI riguarda la capacità di questa tecnica di caratterizzare le proprietà dei composti antipsicotici.

Sia gli antipsicotici tipici, come l'aloiperidolo, che atipici, come la clozapina, l'olanzapina, la quetiapina e il risperidone, si sono rivelati in grado di ridurre gli effetti indotti dall'apomorfina sulla PPI. In generale, tale capacità sembrerebbe correlabile all'affinità esibita da questi composti per i recettori D<sub>2</sub>; infatti l'M100907, un antagonista del recettore 5-HT<sub>2A</sub> dotato di scarsa affinità per i recettori dopaminergici, pur mostrando proprietà antipsicotiche, non riduce gli effetti dell'apomorfina (Powell, 2002). Tra i composti non dopaminergici, solo il buspirone, un agonista parziale del recettore 5-HT<sub>1A</sub>, sembrerebbe in grado di contrastare gli effetti dell'apomorfina sulla PPI. Tuttavia, anche in questo caso, tale capacità sarebbe riconducibile alla presunta abilità del buspirone di bloccare i recettori D<sub>2</sub>, come alcuni studi sembrerebbero suggerire (Lima, 2002).

Il summenzionato M100907, invece, sarebbe efficace nel contrastare gli effetti del DOI (dimetossi-iodoamfetamina), un potente agonista selettivo dei recettori 5-HT<sub>2</sub>, sulla PPI, confermando in tal modo l'ipotesi secondo la quale, gli effetti indotti dagli allucinogeni derivati dell'amfetamina sul *sensorimotor gating* e la stessa PPI, sarebbero attribuibili all'attivazione dei recettori 5-HT<sub>2A</sub>, piuttosto che ai recettori 5-HT<sub>2C</sub> (Padich, 1996). Identiche

considerazioni possono essere fatte per il risperidone e l'amoxapina, entrambi D<sub>2</sub>/5-HT<sub>2</sub> antagonisti e antipsicotici atipici. Al contrario l'aloiperidolo si è dimostrato inefficace nel bloccare gli effetti del DOI (Sipes, 1995). Alcuni antipsicotici atipici, come la stessa clozapina, il risperidone, il ziprasidone, la remoxipride, si sono dimostrati efficaci nei confronti della fenciclidina e di altri antagonisti NMDA (Kumari, 2002). È significativo inoltre che gli antipsicotici tipici non siano caratteristicamente in grado di prevenire la riduzione della PPI mediata da questi composti (Swerdlow, 2001). Gli effetti degli antagonisti NMDA sulla PPI non appaiono essere direttamente correlabili né a meccanismi dopaminergici (sia l'aloiperidolo che la raclopride, un antagonista D<sub>2</sub>, non riducono gli effetti della fenciclidina sulla PPI), né serotoninergici (la ketanserina e la ritanserina, antagonisti non selettivi del recettore 5-HT<sub>2</sub>, hanno mostrato effetti contraddittori (Abel, 2003)). La prazosina, un antagonista dei recettori  $\alpha_1$ -adrenergici, è al contrario in grado di ridurre gli effetti della fenciclidina sulla PPI (Bakshi, 1999). Riassumendo, gli antipsicotici tipici sono in grado di ripristinare i livelli fisiologici di PPI in seguito ad un trattamento con agonisti dopaminergici, ma non con agonisti serotoninergici e antagonisti irreversibili NMDA, mentre gli antipsicotici atipici sembrerebbero poter antagonizzare gli effetti di abolizione della PPI mediati da tutte queste categorie farmacologiche. Su queste basi, è opinione corrente che la capacità differenziale di prevenire l'effetto di abolizione della PPI mediato dagli antagonisti irreversibili NMDA e dagli agonisti dopaminergici possa costituire un parametro attendibile di *screening* tra i farmaci antipsicotici tipici e atipici.

## **1.8 VALIDITÀ PREDITTIVA DELLA PPI: MODELLI AMBIENTALI**

I modelli ambientali di stress psicosociale costituiscono degli strumenti molto validi per riprodurre la sintomatologia di numerosi disturbi neuropsichiatrici, inclusa la schizofrenia, e presentano l'indiscutibile vantaggio di non dover somministrare farmaci.

Le conseguenze negative a lungo termine della privazione di adeguati stimoli necessari per la crescita e la sopravvivenza fin dai primi giorni di vita sono ben documentate, nell'uomo e negli animali. È stato ampiamente dimostrato che esperienze traumatiche subite nei primi

stadi di vita, quali isolamento sociale e/o separazione prolungata dalla madre, possono predisporre allo sviluppo di disturbi mentali, incluse schizofrenia, depressione e disturbi d'ansia in età adulta (Yorgason, 2016). Quindi, uno stress psicosociale persistente e continuo che avviene in uno specifico periodo della vita perinatale dell'individuo, non intacca solo quello stesso stadio dello sviluppo, ma ha un pesante impatto sul neurosviluppo nei successivi anni di vita, poiché i processi cognitivi sono stati irreversibilmente compromessi al tempo della privazione (Logan-Greene, 2015).

Fra i modelli di stress psicosociale nei roditori, uno dei più validati è l'isolamento sociale (*Isolation Rearing, IR*), una manipolazione sperimentale che consiste nella privazione dell'ambiente sociale dallo svezzamento fino all'età adulta. Questo modello sperimentale, altamente traslazionale e isomorfo, produce un insieme di aberrazioni comportamentali che rispecchiano il caratteristico fenotipo osservato in pazienti psicotici, compresa la perdita della PPI. Coerentemente con quanto detto per i modelli farmacologici, il sistema dopaminergico, soprattutto a livello del nucleo accumbens, è quello maggiormente implicato nell'insorgenza dei comportamenti psicosimili nei roditori sottoposti a IR.

Un'altra forma di stress psicosociale, che rientra nei modelli sperimentali ambientali, consiste nella privazione di cure materne nel neonato.

In molte specie di mammifero, compresi l'uomo, i primati e i roditori, il comportamento genitoriale influenza l'organizzazione dei sistemi neurali del piccolo e la stimolazione da parte della madre è essenziale per la maturazione di molte funzioni del sistema nervoso in via di sviluppo. Nell'uomo, la separazione del bambino dal genitore prima dell'adolescenza, è associata a un maggiore rischio di sviluppare psicosi, depressione maggiore e disturbi d'ansia in età post-puberale (Nishi, 2014). L'adolescenza costituisce un periodo critico del neurosviluppo durante il quale la maggior parte dei disturbi neuropsichiatrici, come la schizofrenia, effettuano il loro esordio.

La *maternal separation (MS)* o *maternal deprivation (MD)*, ovvero privazione di cure materne per un determinato periodo, è stata proposta come interessante modello murino di alcuni aspetti della sintomatologia schizoaffettiva. La MS è un modello di stress psicosociale

validato e altamente isomorfo di una condizione umana di abbandono, che negli Stati Uniti costituisce la più frequente forma di maltrattamento dell'infante (Logan-Greene, 2015).

Gli animali di laboratorio sottoposti a ripetuta MS, sviluppano una serie di anomalie, osservate anche nei pazienti schizofrenici, incluso il deficit della PPI. Degno di nota è che questo deficit, insieme ad altri, non si presenta prima dell'età puberale e può essere contrastato dalla somministrazione acuta di antipsicotici. Inoltre, gli effetti della MS sulla PPI dipendono fortemente sia dalle condizioni ambientali presenti *anche dopo* la manipolazione stressogena, sia da specifici fattori genetici, di cui conosciamo l'importanza per il conferimento di un particolare endofenotipo. Infatti, dalla ricerca traslazionale sappiamo che alcuni ceppi di ratti risultano più suscettibili di altri al paradigma della MS: mentre i ratti Wistar sottoposti alla manipolazione mostrano *disruption* della PPI, lo stesso deficit non è osservabile in ratti Fischer 344 o Lewis. Allo stesso modo, sono state evidenziate delle differenze nella risposta di *startle*. La variazione della risposta allo stress nei vari ceppi non indica una insensibilità degli animali verso la MS, ma piuttosto suggerisce che le conseguenze a lungo termine sono diverse (Ellenbroek, 2003).

Oltre ai deficit di PPI, tra le variazioni comportamentali di tipo schizoide mostrate dagli animali sottoposti a MS sono stati osservati: riduzione della *latent inhibition* (LI), ritardata assuefazione o abitramento allo stimolo di *startle* dopo ripetute esposizioni, aumentata sensibilità ad agonisti dopaminergici (e.g. amfetamina, apomorfina). Insieme a queste anomalie comportamentali sono stati evidenziati effetti permanenti a carico dell'asse ipotalamo-ipofisario, che conducono a un incremento dei livelli dell'ormone adrenocorticotropo e corticosterone dovuto ad un aumento della risposta allo stress degli organi coinvolti; e poi ancora alterazioni neurochimiche, alterata espressione genica, ritardo nella crescita (Kuhn, 1998).

Un altro effetto della MS sul comportamento è l'aumento dell'aggressività in topi di laboratorio geneticamente modificati (MAO-A<sup>Ne0</sup>), recanti un polimorfismo allelico dell'enzima monoamino ossidasi A (MAO-A) abbastanza comune nell'uomo (MAO-AuVNTR, 12 % della popolazione maschile). Sebbene non vi siano evidenze cliniche dell'associazione fra MAO-AuVNTR e comportamento violento o aggressivo in soggetti schizofrenici (Perkovic,

2016), i topi MAO-A sottoposti a MS mostrano un fenotipo comportamentale aggressivo. In accordo con le analisi cliniche effettuate da Perkovic e colleghi, i topi MAO-A<sup>Neo</sup> non sottoposti a MS presentano un fenotipo normale, non aggressivo, suggerendo un effetto determinante del paradigma in questo modello animale.

## 2 SCOPO DEL LAVORO

Riuscire a riprodurre un disturbo neuropsichiatrico nell'animale è estremamente complesso, data la soggettiva natura del sintomo, l'eterogeneità del disturbo, la complessa eziologia della patologia. Tuttavia, grazie all'introduzione di *biomarkers* e test diagnostici, siano essi neurochimici, genetici o neurofisiologici, negli ultimi decenni, le neuroscienze traslazionali hanno fatto un enorme passo in avanti e il divario tra clinica e ricerca di base si è significativamente ridotto. Infatti, la misura di tali markers biologici può essere facilmente effettuata sia nell'uomo che nell'animale da laboratorio e spesso la sua alterazione è presente nel paziente affetto da un particolare disturbo neuropsichiatrico e nel modello animale creato ad hoc per riprodurre tale disturbo. Tra questi, La PPI è tra i *biomarkers* più rappresentativi e utilizzati in psichiatria, e anche grazie all'utilizzo di questo strumento, diversi farmaci con marcate potenzialità terapeutiche sono stati introdotti per il trattamento di diverse patologie psichiatriche. Pertanto, in questo lavoro, articolato in prima e seconda parte, presenterò i vantaggi nell'utilizzo di questo strumento diagnostico traslazionale in modelli animali di schizofrenia ottenuti con mezzi farmacologici, ambientali e genetici, associati a tratti impulsivi e aggressivi.

## Prima parte

L'alterazione del *sensorimotor gating* provocata dai farmaci utilizzati nella ricerca preclinica (quali agonisti dopaminergici, antagonisti del recettore glutammatergico NMDA, alcuni agonisti serotoninergici) che provocano deficit di PPI conclamati non è costante, ma varia, a parità di dose, in dipendenza dal genere animale (*Mus* o *Rattus*) e, all'interno della stessa specie, a seconda del ceppo. Anche la reversibilità farmacologica, ovvero la capacità di sanare o portare alla normalità il *sensorimotor gating* antagonizzando l'attivazione dei recettori, è estremamente variabile fra le specie (Mosher *et al.*, 2015) e può avvenire mediante l'attivazione, la modulazione o l'antagonismo di altri substrati neurotrasmettitoriali (Frau *et al.*, 2014).

In questa prima parte della tesi descriverò le differenze nella risposta ai farmaci psicotomimetici più utilizzati in ambito preclinico di diversi ceppi di ratti (Sprague-Dawley, Wistar e Long-Evans) e la sensibilità di questi ultimi ai farmaci antipsicotici capaci di contrastare tali effetti.



## 3 METODI

### 3.1 ANIMALI

L'utilizzo degli animali di laboratorio e le procedure impiegate per gli esperimenti sono conformi a quanto indicato nel decreto legislativo del 4 marzo 2014 (GU n.61), in ottemperanza all'attuazione della direttiva 2010/63/UE in materia di regolamentazione dell'utilizzo degli animali a fini scientifici. La stabulazione degli animali risponde ai requisiti richiesti dal suddetto DL (allegato III).

Lo studio è stato condotto su ratti maschi dei ceppi Sprague-Dawley, Wistar e Long-Evans di età di 3-4 mesi (peso 250-350 g) e su topi maschi di 3 mesi d'età (18-24 g) dei ceppi DBA/2J e C57 BL/6J. I ratti sono stati alloggiati in numero di 3-4 per gabbia in stanze di stabulazione mantenute alla temperatura di  $22 \pm 2$  °C, all'umidità del 60 %, e sottoposti a un ciclo luce/buio artificiale di 12/12 ore. Acqua e cibo sono stati resi disponibili *ad libitum*. Per ridurre lo stress durante le fasi sperimentali, ogni animale è stato abituato alla manipolazione dall'operatore per 5 minuti al giorno una settimana prima degli esperimenti.

I topi sono stati alloggiati in stanze di stabulazione separate da quelle dei ratti, mantenute nelle medesime condizioni di umidità e temperatura, con lo stesso ciclo luce/buio. Gli animali, in numero di 5-6 per gabbia, disponevano di cibo ed acqua *ad libitum*.

### 3.2 APPARATI E PROCEDURE SPERIMENTALI

#### 3.2.1 Startle Reflex System

Il sistema per il rilevamento del riflesso di startle (Med Associates, St Albans, Vermont) consiste di quattro contenitori cilindrici di plexiglass alloggiati all'interno di altrettante camere insonorizzate provviste di ricambio d'aria mediante ventilazione. In ogni camera, i contenitori cilindrici, di diametro di 9 cm, sono montati su una piastra piezoelettrica accelerometrica collegata ad un convertitore analogico-digitale. Il rumore di fondo e gli

stimoli acustici vengono erogati da due altoparlanti( ANL-925C) per camera posti 7 cm sopra il contenitore di plexiglass in modo da avere al loro interno una differenza di solo 1 dB. Sia gli altoparlanti sia la piastra accelerometrica sono collegati ad un computer dal quale è possibile controllare tutte le variabili per mezzo dell'apposito software. Gli stimoli acustici sono stati misurati in intensità e bilanciati prima di ogni sessione di esperimenti mediante l'utilizzo di un fonometro digitale. La risposta meccanica relativa ad ogni piastra è stata impostata e resa uniforme in ogni parte della piattaforma mediante il calibratore (spinner) a 10 Hz fornito in assortimento dalla Med Associates.

### ***3.2.2 Configurazione e protocollo sperimentale***

Il protocollo sperimentale che utilizziamo per la valutazione del riflesso di startle (Fig. 2) è composto da un periodo di acclimation seguito da tre insiemi di stimoli acustici (trials) che chiamiamo "blocchi". Il periodo di acclimation ha una durata di 5 minuti durante i quali è erogato solo il rumore di fondo (65 dB), che rimane costante per tutta la durata dell'esperimento e quindi anche durante i blocchi successivi (Tab. 1).

Il primo blocco consiste di 5 stimoli acustici (pulse) di rumore bianco dell'intensità di 120 dB e di brevissima durata; questo primo blocco serve per rilevare la risposta del riflesso di startle e, inoltre, per ricavare il grado di abituamento dell'animale al termine della sessione sperimentale (Tab. 2).

Nel secondo blocco insieme agli stimoli di startle sono introdotti anche i pre-stimoli (pre-pulse) a tre diverse intensità (68, 71 e 77 dB) che precedono le pulse di pochi millisecondi (Tab. 5). All'interno di questo blocco sono inseriti anche dei trials in cui nessuno stimolo acustico è erogato (no-pulse) eccetto il rumore di fondo. Durante i trials di no-pulse, non è attesa nessuna risposta di riflesso da parte dell'animale, ma la sua attività viene comunque registrata dal sistema ed entra a far parte della raccolta di dati in qualità di controllo o baseline.

Il secondo blocco è quello che ci consente di misurare il grado di inibizione di startle ed è costituito da un totale di 12 pulse, 30 prepulse e 8 no-pulse in successione pseudorandom e

distanziati di un numero variabile di secondi. Le pre-pulse consistono di brevi stimoli acustici di white noise di 3, 6 e 12 dB sopra il rumore di fondo che precedono le pulse di 120 dB (Tab. 5).

Il terzo e ultimo blocco consiste di altri 5 stimoli acustici di pulse e viene utilizzato per valutare il grado di abituamento dell'animale facendo una comparazione col primo blocco, dal quale differisce solo per la presentazione pseudorandom degli stimoli (Tab. 4).

Le seguenti tabelle descrivono la configurazione del protocollo che utilizziamo per i nostri esperimenti di PPI.

**Tab. 1**

**ACCLIMATION**

<b>ENABLE ACCLIMATION AUXILIARY</b>	OFF
<b>ENABLE ACCLIMATION BACKGROUND NOISE</b>	ON
<b>ACCLIMATION BACKGROUND NOISE LEVEL</b>	65 dB

**Tab. 2**

	<b>BLOCK 1</b>	<b>BLOCK 2</b>	<b>BLOCK 3</b>
<b>STARTLE STIMULUS</b>	ENABLED	ENABLED	ENABLED
<b>STIMULUS TYPE</b>	WHITE NOISE	WHITE NOISE	WHITE NOISE
<b>DURATION (ms)</b>	40	40	40
<b>LEVEL (dB)</b>	120	120	120

**Tab. 3**

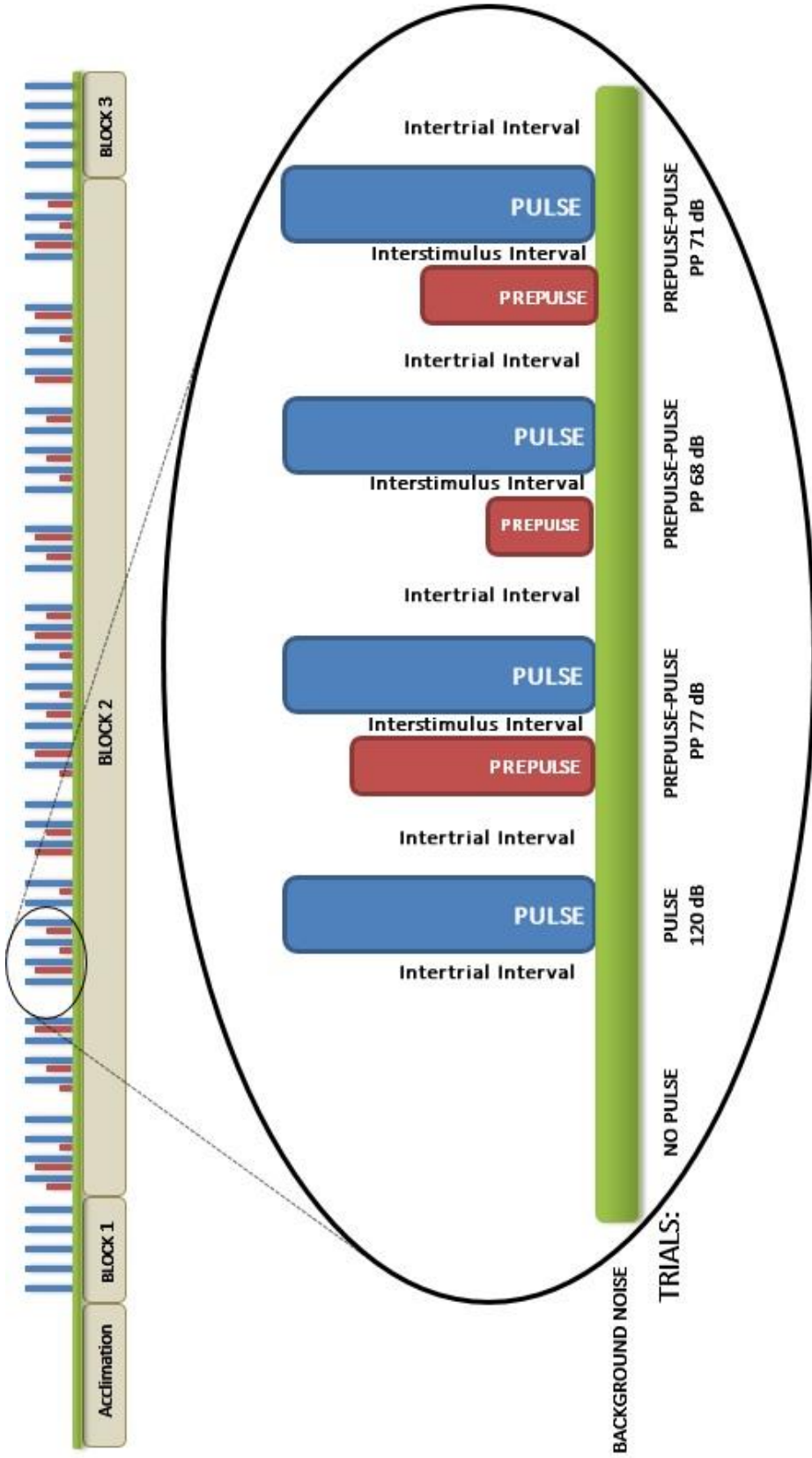
	<b>BLOCK 1</b>	<b>BLOCK 2</b>	<b>BLOCK 3</b>
<b>PREPULSE STIMULUS</b>	DISABLED	ENABLED	DISABLED
<b>STIMULUS TYPE</b>	-	WHITE NOISE	-
<b>DURATION (ms)</b>	-	20	-
<b>LEVEL (dB)</b>	-	68, 71, 77	-

**Tab. 4**

	<b>BLOCK 1</b>	<b>BLOCK 2</b>	<b>BLOCK 3</b>
<b>TRAILS</b>	5	50	5
<b>INTER-TRIAL INTERVAL TYPE</b>	variable	variable	variable
<b>INTER-TRIAL INTERVAL (s)</b>	10 to 20	10 to 15	10 to 15

**Tab. 5**

<b>GENERAL</b>	<b>BLOCK 1</b>	<b>BLOCK 2</b>	<b>BLOCK 3</b>
<b>BACKGROUND NOISE (dB)</b>	65	65	65
<b>NULL PERIOD (ms)</b>	120	100	120
<b>PREPULSE/STARTLE DELAY (ms)</b>	0	100	0



**Fig.2** Raffigurazione schematica del paradigma della PPI con la configurazione utilizzata negli esperimenti di questo lavoro. La linea verde orizzontale rappresenta il rumore di fondo di 65 Db, mentre la barra beige al di sotto indica le 4 fasi della sessione sperimentale (acclimation, block 1, block 2 e block 3). Le barre blu rappresentano gli stimoli di pulse di 120 dB, le barre rosse rappresentano le prepulse (PP) le cui dimensioni riflettono in ordine di grandezza le intensità di 68, 71 e 77 dB. In dettaglio sono mostrati i cinque tipi di trial (in ordine nella figura: no pulse, pulse, PP77, PP68 e PP71) e sono messi in evidenza gli intervalli fra due stimoli consecutivi (Intertrial Interval) e fra un prestimolo e lo stimolo (Interstimulus Interval).

**Tab. 6****BLOCK 2**

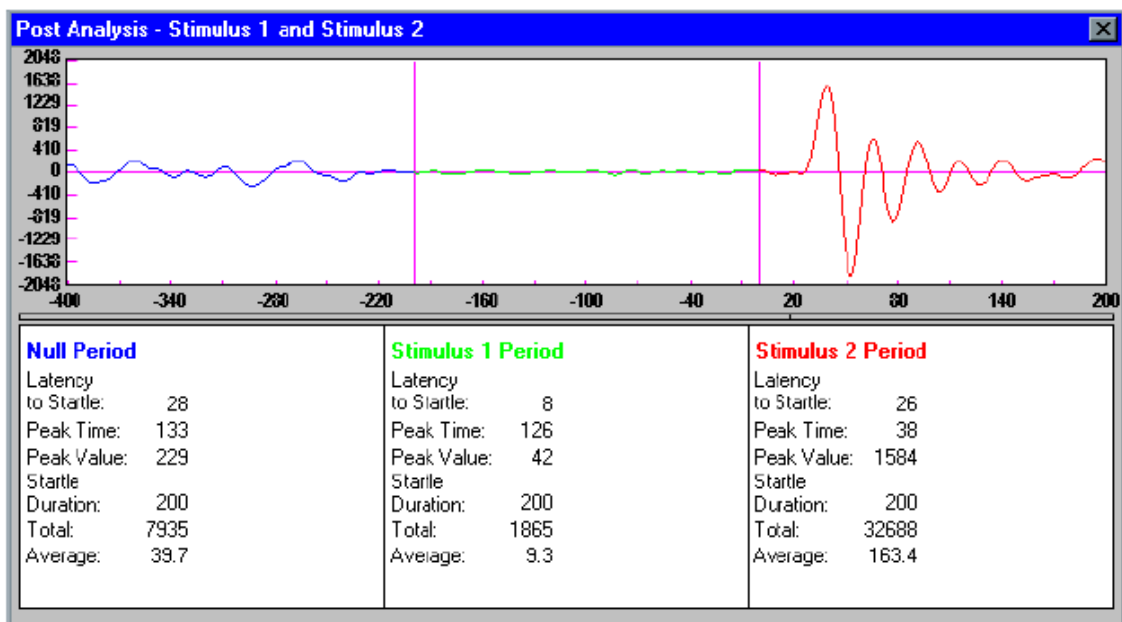
<b>TRIAL №</b>	<b>TRIAL TYPE</b>	<b>PREPULSE (dB)</b>	<b>PULSE (dB )</b>
<b>1</b>	PREPULSE	6	120
<b>2</b>	PREPULSE	12	120
<b>3</b>	PREPULSE	3	120
<b>4</b>	PULSE	-	120
<b>5</b>	NO-PULSE	-	-
<b>6</b>	PREPULSE	3	120
<b>7</b>	PREPULSE	6	120
<b>8</b>	PULSE	-	120
<b>9</b>	PREPULSE	12	120
<b>10</b>	NO-PULSE	-	-
<b>11</b>	PULSE	-	120
<b>12</b>	PREPULSE	12	120
<b>13</b>	PREPULSE	3	120
<b>14</b>	PREPULSE	6	120
<b>15</b>	PULSE	-	120
<b>16</b>	PREPULSE	3	120
<b>17</b>	NO-PULSE	-	-
<b>18</b>	PREPULSE	12	120
<b>19</b>	PREPULSE	6	120
<b>20</b>	PULSE	-	120
<b>21</b>	NO-PULSE	-	-
<b>22</b>	PREPULSE	3	120
<b>23</b>	PREPULSE	12	120
<b>24</b>	PULSE	-	120

<b>25</b>	PREPULSE	6	120
<b>26</b>	PREPULSE	3	120
<b>27</b>	PULSE	-	120
<b>28</b>	PREPULSE	3	120
<b>29</b>	PREPULSE	12	120
<b>30</b>	PREPULSE	6	120
<b>31</b>	NO-PULSE	-	-
<b>32</b>	PULSE	-	120
<b>33</b>	PREPULSE	6	120
<b>34</b>	PREPULSE	12	120
<b>35</b>	NO-PULSE	-	-
<b>36</b>	PULSE	-	120
<b>37</b>	PREPULSE	3	120
<b>38</b>	PREPULSE	6	120
<b>39</b>	PULSE	-	120
<b>40</b>	PREPULSE	6	120
<b>41</b>	NO-PULSE	-	-
<b>42</b>	PREPULSE	12	120
<b>43</b>	PULSE	-	120
<b>44</b>	PREPULSE	3	120
<b>45</b>	PREPULSE	12	120
<b>46</b>	NO-PULSE	-	-
<b>47</b>	PULSE	-	120
<b>48</b>	PREPULSE	12	120
<b>49</b>	PREPULSE	3	120
<b>50</b>	PREPULSE	6	120

### 3.2.3 Identificazione della risposta di startle

Ogni volta che uno stimolo acustico (o una no-pulse) si presenta, la risposta motoria dell'animale che ne consegue viene trasmessa sotto forma di energia meccanica alla piastra piezoelettrica che la trasforma in un segnale analogico convertito poi in digitale per essere infine elaborato dal sistema analitico del computer. La risposta motoria originata dal riflesso di startle dell'animale assume la forma di una serie di onde di ampiezza e frequenza proporzionali all'intensità della risposta stessa (Fig.3). Le oscillazioni della piastra generatesi rappresentano, quindi, la risposta allo stimolo e costituiscono il materiale per il campionamento.

Per il calcolo della risposta totale e la media prendiamo in considerazione l'area sottesa alla curva fra il primo massimo d'onda positivo e il successivo minimo d'onda (Startle Response Only), escludendo dal calcolo i movimenti residui della piastra che rimangono per ancora pochi millisecondi, finché l'oscillazione non si estingue.



**Fig. 3** Rappresentazione della schermata del programma Startle Reflex System in fase post analisi. In alto le linee colorate rappresentano l'attività/risposta motoria dell'animale rispettivamente durante le fasi di: null period (linea blu); erogazione della prepulse (linea verde); erogazione della pulse (linea rossa).



L'identificazione della risposta di startle si basa su criteri che possono essere fissati a nostro piacimento, tenendo conto delle tempistiche e le modalità con cui avviene il riflesso motorio. Per il riconoscimento del riflesso, abbiamo fissato una latenza minima di 20 ms in modo che ogni movimento rilevato prima di questo periodo non venga riconosciuto come tale, poiché costituirebbe un falso positivo. Infatti, il riflesso di startle, sia nell'uomo sia negli animali, ha bisogno di qualche centinaia di millisecondi prima di manifestarsi, perciò tutto quello che avviene prima non è utile per la sua misurazione.

Un altro parametro che abbiamo fissato per l'identificazione del riflesso è il valore di picco minimo, sotto il quale un'onda non è considerata facente parte della risposta di startle. Infine il tempo di picco minimo esclude dal riconoscimento del riflesso tutte quelle oscillazioni che durano meno di questo tempo (Tab. 7).

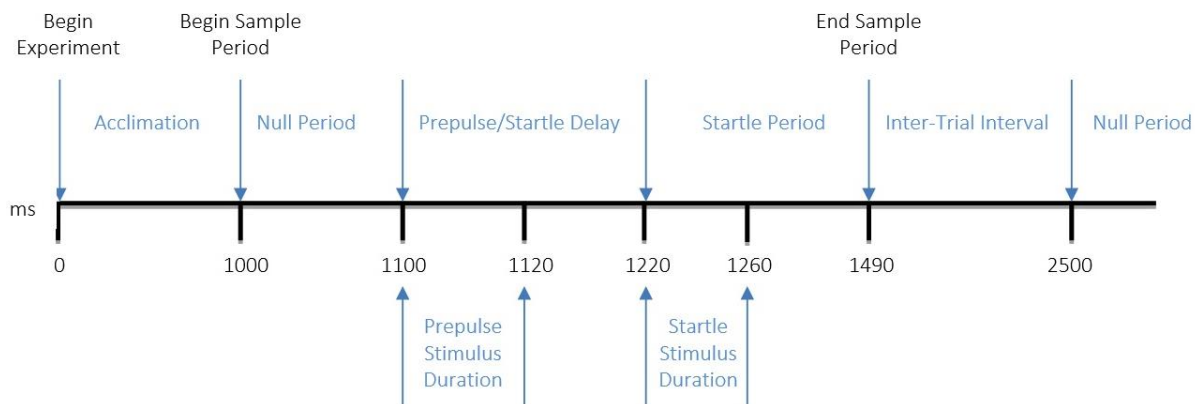
**Tab. 7**

**DATA OPTIONS**

<b>STARTLE RESPONSE ONLY</b>	
<b>MINIMUM LATENCY (ms)</b>	20
<b>MINIMUM PEAK VALUE</b>	50
<b>MINIMUM PEAK TIME (ms)</b>	30

**3.2.4 Campionamento dei dati**

La raccolta dei dati da parte del software avviene entro una finestra temporale chiamata periodo di campionamento che sta nell'intorno dello stimolo di startle. Tipicamente, la risposta di startle avviene entro 200 ms dalla presentazione di una pulse, ma il campionamento dei dati inizia prima, in un lasso di tempo chiamato null period (Fig. 4) che dura 100-120 ms a seconda del tipo di stimolo (Tab. 5). Questo periodo rappresenta una sorta di baseline interna al campione ed è inclusa anche nel campionamento della no-pulse (120 ms).



**Fig. 4** Rappresentazione schematica esemplificativa della timeline utilizzata per il campionamento dei dati, in questo caso di quelli relativi al primo trial dell'esperimento. Per semplicità, la durata del periodo di acclimation è di 1000 ms (1 s), ma nel nostro protocollo è di 5 min; inoltre, il primo trial non è una prepulse ma una pulse (block 1).

### **3.2.5 Razionale e disegno sperimentale I**

Gli innumerevoli studi condotti sui modelli animali per chiarire in che modo la dopamina è coinvolta nella regolazione della PPI sono arrivati a diversificare i singoli ruoli dei recettori  $D_1$  e  $D_2$ . Nei topi, il relativo contributo dei recettori dopaminergici dipende dal ceppo e i recettori  $D_1$  sembrano essere i principali mediatori del sistema di controllo della PPI. Viceversa, nei ratti, non è stato ancora chiarito in quale misura i singoli recettori influenzano il sensorimotor gating.

Numerose evidenze suggeriscono un ruolo preponderante dei recettori  $D_2$  nei ratti, dato che i deficit di PPI si sono osservati conseguentemente alla somministrazione di agonisti per questo sottotipo recettoriale e soprattutto perché gli agonisti  $D_1$  non causano gli stessi effetti osservati nei topi. In effetti, la somministrazione di agonisti dopaminergici  $D_1$  provoca disfunzioni di gating nei ratti, ma questa osservazione è attribuibile all'attivazione dei  $D_2$ , considerato che questi composti hanno la peculiarità di potenziare gli effetti degli agonisti  $D_2$  e degli antagonisti glutammatergici NMDA. Il tentativo di considerare un potenziale ruolo mediato dai  $D_1$  nei ratti, ancora una volta, fallisce quando si somministrano alte dosi di agonisti per questi recettori. Infatti, la loro azione farmacologica non è più mediata dai  $D_1$ , per i quali esibiscono una preferenza, ma bensì dai  $D_2$ , a causa della perdita di selettività

recettoriale dose-dipendente. Esistono, tuttavia, alcuni studi che documentano l'avvenuta perdita di PPI in seguito a somministrazione di agonisti  $D_1$  nei ratti, sebbene non siano confutati dall'utilizzo di relativi antagonisti.

Un nostro primo obiettivo è stato avvalorare l'ipotesi secondo cui alcuni ceppi di ratti mostrano una diminuzione della funzione di gating in seguito a somministrazione di agonisti  $D_1$  in modo simile alla maggior parte dei ceppi murini, e testare il potere degli antagonisti  $D_1$  di normalizzare la capacità di gating.

Il primo studio è costituito da sei esperimenti, ciascuno dei quali ha coinvolto 8-13 ratti per gruppo. Ogni animale è stato assegnato al proprio gruppo sperimentale sulla base dei risultati di una prova effettuata 3 giorni prima degli esperimenti; questo pre-test consente di formare dei gruppi omogenei in modo da minimizzare la variabilità all'interno di ciascun gruppo e migliorarne la valenza statistica.

Il primo esperimento era mirato a individuare la dose di SKF82958 (puro agonista  $D_1$ ) utile a provocare alterazioni della PPI nei tre ceppi di ratti Sprague-Dawley (SD), Wistar (WIS) e Long Evans (LE), nelle nostre condizioni sperimentali.

Come accennato sopra, studi precedenti hanno dimostrato che nei ratti SD la *disruption* provocata dall'SKF82958 è ascrivibile all'attivazione dei recettori  $D_2$  invece che a quella dei  $D_1$ ; la spiegazione del meccanismo d'azione dell'agonista su questo ceppo di ratti potrebbe essere attribuibile al rapporto di selettività nei confronti dei recettori dopaminergici che è di 10:1 ( $D_1:D_2$ ), quindi risulta piuttosto modesto se paragonato a composti della stessa classe farmacologica. Per verificare se questo fenomeno fosse presente negli altri ceppi di ratti oggetto del nostro studio, abbiamo valutato se la somministrazione di un antagonista del recettore  $D_1$  (SCH23390) potesse normalizzare la perdita di gating, in modo da individuare quale dei due recettori stesse mediando la disfunzione di PPI indotta da SKF82958. Il terzo esperimento rispecchia in parte il disegno del precedente, con la sola differenza che stavolta abbiamo utilizzato un antagonista per il recettore  $D_2$ , l'L741626, per cercare di riportare la funzione di gating a livelli fisiologici.

Successivamente, abbiamo testato la capacità dell'agonista parziale del recettore  $D_1$  SKF38393 di provocare *disruption* negli animali appartenenti ai tre ceppi.

Nel quinto esperimento, abbiamo valutato l'effetto del prototipico agonista del recettore D<sub>2</sub> quinpirolo nei ratti SD e LE e l'effetto dell'antagonista D<sub>2</sub> L741626 sulla *disruption* ottenuta col quinpirolo.

L'esperimento finale di questo studio consisteva nel testare l'apomorfina su tutti e tre i ceppi di ratti.

### **3.2.6 Farmaci I**

In questo studio sono stati utilizzati i seguenti farmaci: SKF82958 idrobromuro, SKF38393, SCH23390, L741626, apomorfina idrocloruro e quinpirolo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). L'SKF82958, l'SKF38393, l'SCH23390 e il quinpirolo sono stati solubilizzati in soluzione salina allo 0,9 %. L'L741626 è stato portato in soluzione con un veicolo (VEH) costituito da soluzione salina (0,9 %) e 1 mg·ml<sup>-1</sup> di acido lattico. Il veicolo dell'apomorfina (VEH) è stato preparato con soluzione salina (0,9 %) e 1 mg·ml<sup>-1</sup> di acido ascorbico per evitare l'ossidazione del farmaco. I farmaci o i rispettivi veicoli sono stati somministrati sotto cute (s.c.) o per via intraperitoneale (i.p.) in un volume di iniezione di 1ml·Kg<sup>-1</sup>.

### **3.2.7 Razionale e disegno sperimentale II**

Contestualmente alle differenze di sensibilità farmacologiche ai vari composti psicotomimetici osservate in diversi ceppi di ratti e topi, ho contribuito allo studio sulla funzione dei recettori GABA nella regolazione del gating (Bortolato, 2007). Sono emerse delle differenze della risposta farmacologica al prototipico modulatore positivo allosterico (PAM) del recettore GABA<sub>B</sub> (baclofen), il quale si è rivelato efficace nel contrastare la caratteristica perdita spontanea di PPI nei topi del ceppo DBA/2J, ma inefficace nel contrastare la perdita di PPI indotta farmacologicamente nei topi appartenenti al ceppo C57BL/6J.

Alla luce del coinvolgimento del sistema GABAergico in un effetto antipsicotico-simile, ma considerati gli effetti secondari neuromuscolari indotti dal baclofen, abbiamo utilizzato il *rac-*

BHFF, un farmaco analogo, per valutare la risposta nei due ceppi di topi (DBA/2J e C57BL/6) e nei ratti SD.

Il nostro secondo obiettivo quindi era confermare il coinvolgimento del sistema GABAergico, oltre a quello dopaminergico, nella regolazione della PPI, proponendo un nuovo possibile strumento per il trattamento degli stati psicotico-simili.

La procedura sperimentale utilizzata è simile alla precedente utilizzata per i ratti (par 3.2.8) con le uniche differenze riguardanti i test sui topi. Per questi animali, più piccoli e di peso inferiore rispetto ai ratti, sono stati usati dei cilindri di plexiglass con diametro di 3,2 cm e la macchina Startle Reflex è stata impostata in modalità “*mouse*”, con la piattaforma meno rigida e più sensibile ai movimenti più lievi.

### **3.2.8 Farmaci II**

Per questi esperimenti sono stati utilizzati i seguenti farmaci: *rac*-BHFF (Hoffmann-La Roche, Basilea, Svizzera); dizocilpina (MK801) (Sigma-Aldrich, Milano); baclofen (Tocris Cookson, Bristol, GB); clozapina (Sigma-Aldrich).

Il *rac*-BHFF è stato sospeso in un veicolo costituito da Cremophor EL, glicole propilenico e acqua distillata (in rapporto 4:1:30) e somministrato per os (via intragastrica) in volume di 10 mg·Kg<sup>-1</sup>. L'antagonista NMDA dizocilpina (DIZ) e il baclofen (BAC) sono stati solubilizzati in soluzione salina (0,9 %) e somministrati s.c. e i.p., rispettivamente. Infine, la clozapina (CLO), è stata solubilizzata con una goccia di HCl 1N, portata a volume con soluzione salina e corretta con NaHCO<sub>3</sub> per raggiungere un valore di pH fisiologico (pH= 7). I farmaci sono stati somministrati in volumi di iniezione di 1ml·Kg<sup>-1</sup> per i ratti e di 10 ml·Kg<sup>-1</sup> per i topi.

### **3.2.9 Analisi dei dati**

La normalità e l'omoschedasticità dei dati è stata verificata con i test Kolmogorov-Smirnov e Barlett. I dati relativi ai gruppi sperimentali sono stati analizzati con il test statistico di analisi della varianza (ANOVA) a una o due vie, a seconda del numero dei fattori. Le analisi post hoc

sono state effettuate usando il test di Tukey applicando la correzione Spjøtvoll-Stoline. Tutti i dati sono espressi come media  $\pm$  SEM. Il limite fissato per la significatività statistica è stato  $p = 0,05$ .

## 4 RISULTATI

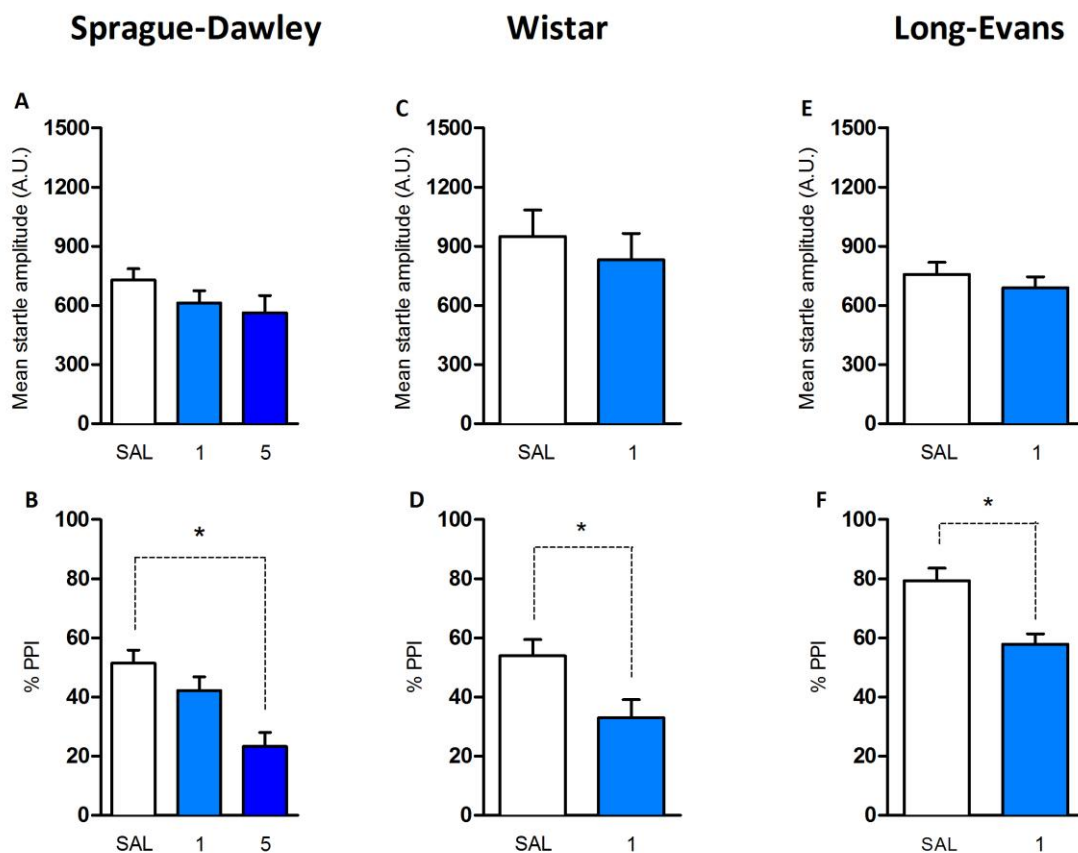
In tutti gli esperimenti elencati in precedenza, la percentuale di diminuzione della PPI (PPI %) è stata calcolata sulla base dei valori ottenuti durante i *trials* del secondo blocco del protocollo secondo la formula:

$$100 - \left\{ \frac{\bar{A} \text{ trial prepulse pulse}}{\bar{A} \text{ trial pulse}} \right\} \times 100 = (\% \text{ PPI})$$

Dove  $\bar{A}$  è l'ampiezza media della risposta di startle al *trial* prepulse-pulse (al numeratore) e della risposta di startle al *trial* pulse (al denominatore). Nei seguenti, grafici l'ampiezza media di startle è espressa in unità arbitrarie (A.U.); la PPI è riportata come diminuzione percentuale (% PPI).

### 4.1 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEGLI AGONISTI RECETTORIALI D<sub>1</sub> NEI RATTI SPRAGUE-DAWLEY, WISTAR E LONG-EVANS

Nella prima serie di esperimenti, abbiamo testato l'agonista per il recettore D<sub>1</sub> SKF82958 sul *gating* in ratti SD, WIS, e LE (n= 9 per gruppo, per ogni ceppo) alle dosi di 1 e 5 mg·Kg<sup>-1</sup> somministrato per via sottocutanea 10 minuti prima dell'inizio del test (Fig. 5). Nei ratti SD, il farmaco non ha modificato l'ampiezza della risposta di startle (Fig. 5A), ma la sua dose più alta di 5 mg·Kg<sup>-1</sup> ha avuto un effetto sulla PPI, riducendola in modo significativo rispetto agli animali di controllo [F(2,24) = 8,71; p < 0,05] a cui è stata somministrata solo la soluzione salina (Fig. 5D). Negli animali WIS (Fig. 5B e E) e LE (Fig. 5C e F), invece, è bastata la dose minima di 1 mg·Kg<sup>-1</sup> per ridurre la PPI in modo significativo [WIS: F(1,16)= 4,69; LE: F(1,16)= 29, 38; p<0,05], lasciando inalterata la risposta di startle.



**Fig. 5** Rappresentazione grafica dell'effetto dell'agonista puro D1 SKF82958 somministrato a due diverse dosi (1 e 5 mg·Kg<sup>-1</sup>) o del suo veicolo (SAL) sulla risposta di startle (in alto) e sulla PPI (in basso) in ratti appartenenti ai diversi ceppi (SD, WIS, LE). Gli istogrammi rappresentano le medie ±SEM ottenute per ogni gruppo sperimentale. \*p < 0,05.

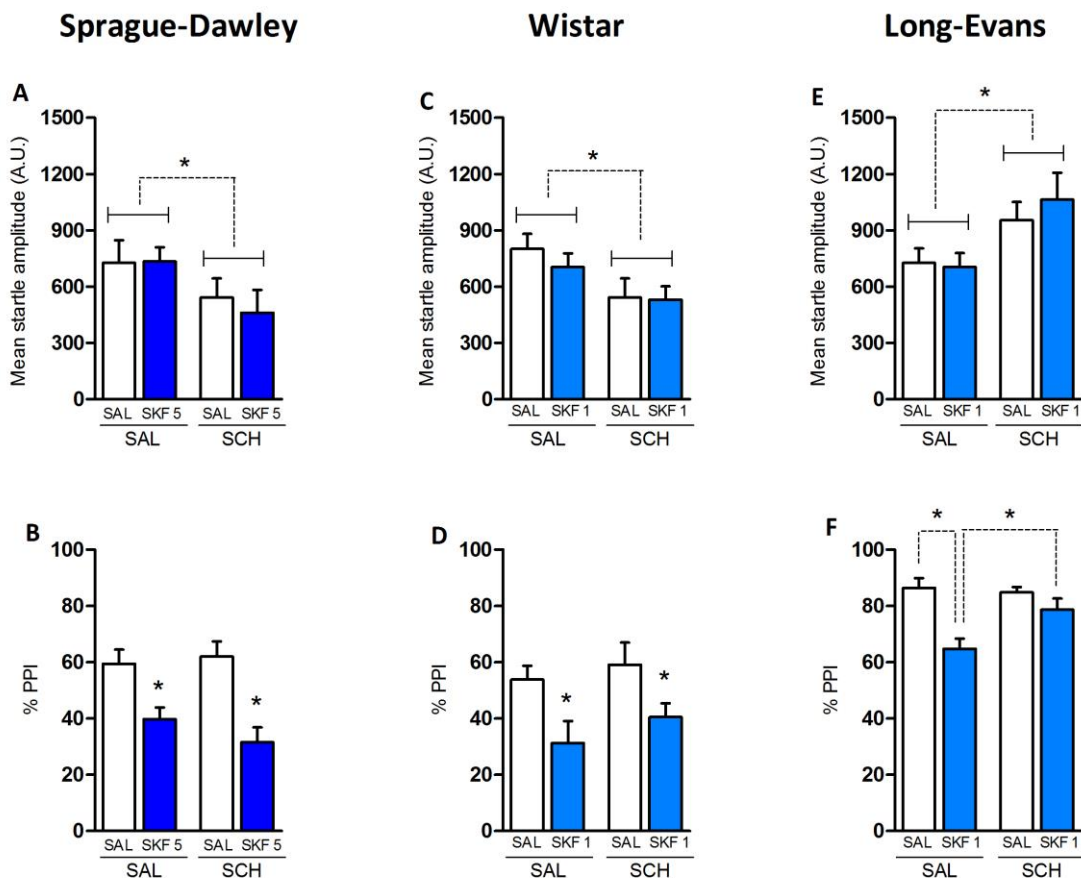
Il trattamento dei ratti SD (n=10 per gruppo) con l'antagonista D<sub>1</sub> SCH23390, somministrato 10 minuti prima dell'iniezione dell'SKF82958 o del suo veicolo, ha avuto un effetto principale [*main effect*: F(1,36) = 5,28; p < 0,05]: mentre la risposta di startle è stata significativamente abbattuta, lo stesso parametro è rimasto invariato in seguito al trattamento con l'SKF82958 (5 mg·Kg<sup>-1</sup>) o alla sua interazione con l'SCH23390 (Fig. 6). Sempre in questo ceppo di ratti, l'SKF82958 si è rivelato efficace nell'indurre deficit di PPI, ma reputiamo che questo effetto sia dovuto all'attivazione dei D<sub>2</sub> e non dei D<sub>1</sub>. Infatti, la somministrazione dell'antagonista D<sub>1</sub> SCH23390 non ha cambiato questa condizione.

Gli effetti della combinazione dei trattamenti farmacologici nei ratti SD rispecchiano in parte quelli ricavati dai successivi esperimenti effettuati sui ratti Wistar (n = 9 per gruppo), in cui la



*disruption* di PPI [ $F(1,32) = 15,82$ ;  $p < 0,05$ ] avvenuta in seguito a trattamento con SKF82958 ( $1 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ), non è riportata alle condizioni fisiologiche dall'antagonista  $D_1$  SCH23390. Quest'ultimo, inoltre, ha avuto anche un effetto principale sulla startle [ $F(1,32) = 19,09$ ;  $p < 0,05$ ], diminuendola significativamente.

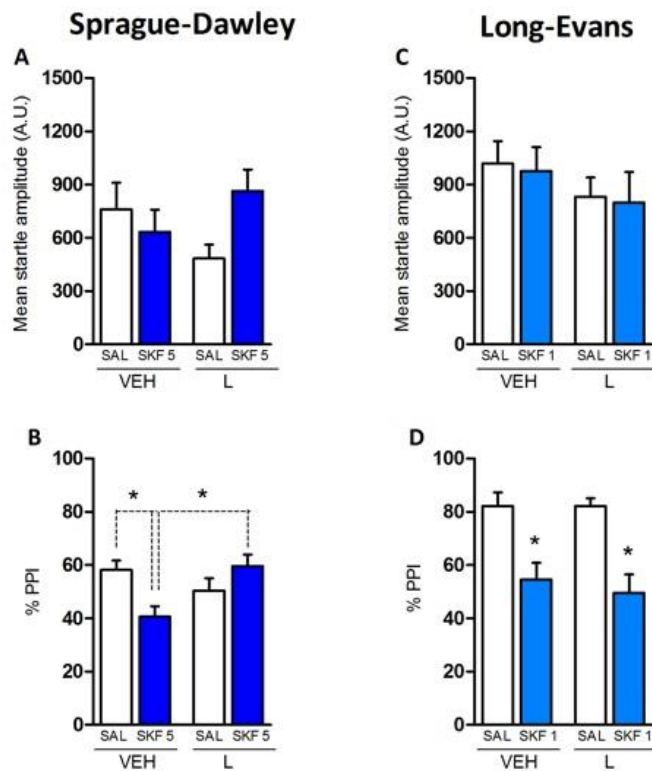
A differenza di quanto osservato nei ceppi albinici, il pretrattamento con l'SCH23390 somministrato ai ratti appartenenti al ceppo LE ( $n = 8-10$  ratti per gruppo) ha prodotto un significativo aumento della risposta di startle. Tuttavia, l'analisi statistica non ha evidenziato né un effetto principale dell'agonista  $D_1$  SKF82958 né un'interazione fra i due trattamenti (SCH23390 vs SKF82958). Per ciò che riguarda l'effetto sulla PPI, anche nei ratti LE, la somministrazione di SKF82958 induce una diminuzione di questo indice, il quale è prevenuto dal pretrattamento con SCH23390, a differenza di quanto accade per i ceppi albinici. Questo risultato conferma che la diminuzione di PPI indotta dall'agonista  $D_1$  SKF82958, nei ratti LE, è mediata proprio dai recettori  $D_1$ , dal momento che il loro antagonista contrasta l'abbassamento dell'indice di sensorimotor gating.



**Fig. 6** Rappresentazione grafica dell'effetto del pre-trattamento con l'antagonista  $D_1$  SCH23390 sulla startle (in alto) e sulla PPI (in basso) in combinazione con il trattamento con l'agonista  $D_1$  SKF82958 alle dosi efficaci rispettive nei ratti SD ( $5 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ), WIS e LE ( $1 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ). Gli istogrammi rappresentano le medie  $\pm$ SEM ottenute per ogni gruppo sperimentale. \* $p < 0,05$ .

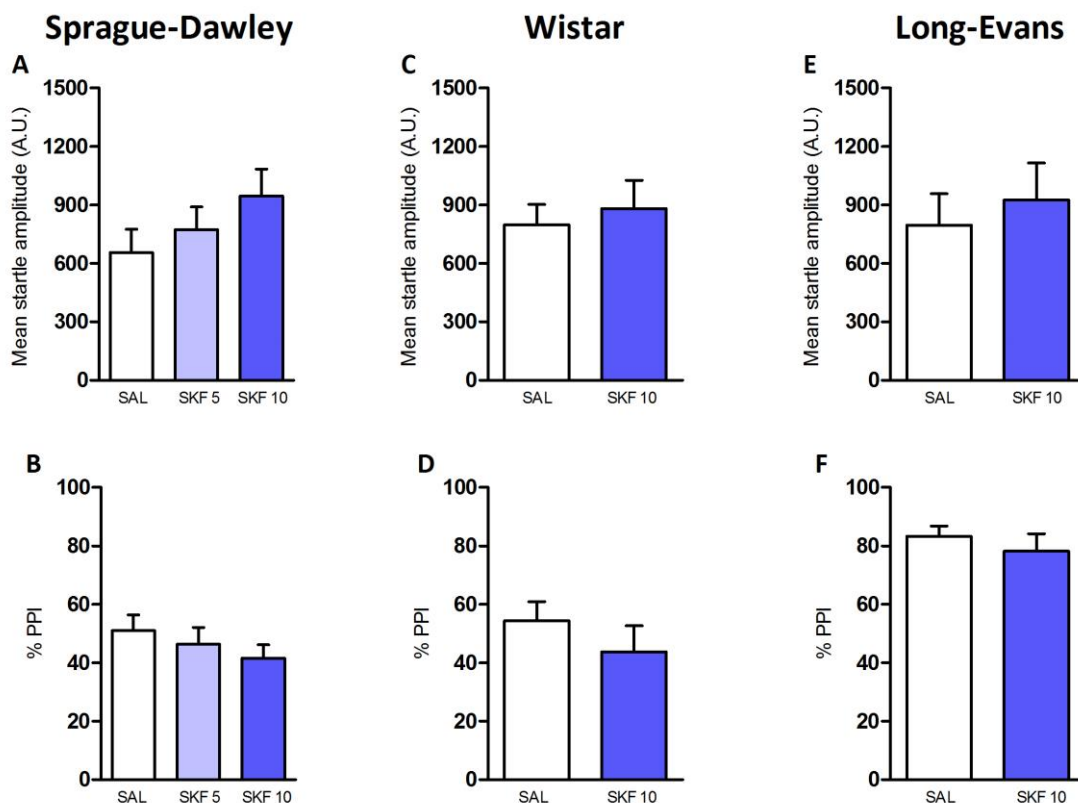
I successivi esperimenti sono stati condotti per ottenere ulteriori informazioni sui ruoli relativi dei recettori  $D_2$  o  $D_1$  nel meccanismo di controllo della PPI in un ceppo albino (SD) e nei ratti LE. A tale scopo, ci siamo serviti dell'antagonista selettivo per i recettori  $D_2$  L741626 (Fig. 7). In seguito alla somministrazione dell'antagonista  $D_2$  L741626 (s.c.,  $1 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ) in combinazione con l'agonista  $D_1$  SKF82958 (s.c.,  $5 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ), non abbiamo osservato nessuna alterazione della risposta di startle nei ratti SD ( $n = 10$  per gruppo) e LE ( $n = 8$  per gruppo). Viceversa, sono emerse delle differenze nella risposta di PPI: i deficit di PPI indotti dall'SKF82958, presentatisi negli animali appartenenti a entrambi i ceppi, sono rimasti

inalterati nei ratti LE pretrattati con L741626, mentre nei ratti SD pretrattati allo stesso modo, la riduzione della PPI è stata efficacemente contrastata [ $F(1,36) = 17,29$ ;  $p < 0,05$ ].



**Fig. 7** Rappresentazione grafica dell'effetto della somministrazione dell'agonista  $D_1$  SKF82958 in combinazione con l'antagonista  $D_2$  L741626 sulla startle (in alto) e sulla PPI (in basso) nei ratti SD e LE. Gli istogrammi rappresentano le medie  $\pm$ SEM ottenute per ogni gruppo sperimentale. \* $p < 0,05$ .

Infine, abbiamo testato l'agonista parziale per il recettore  $D_1$  SKF38393 (s.c., 5-10  $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ), che non ha influenzato nessun parametro (startle e PPI) nei ratti appartenenti ai tre ceppi (Fig. 8).

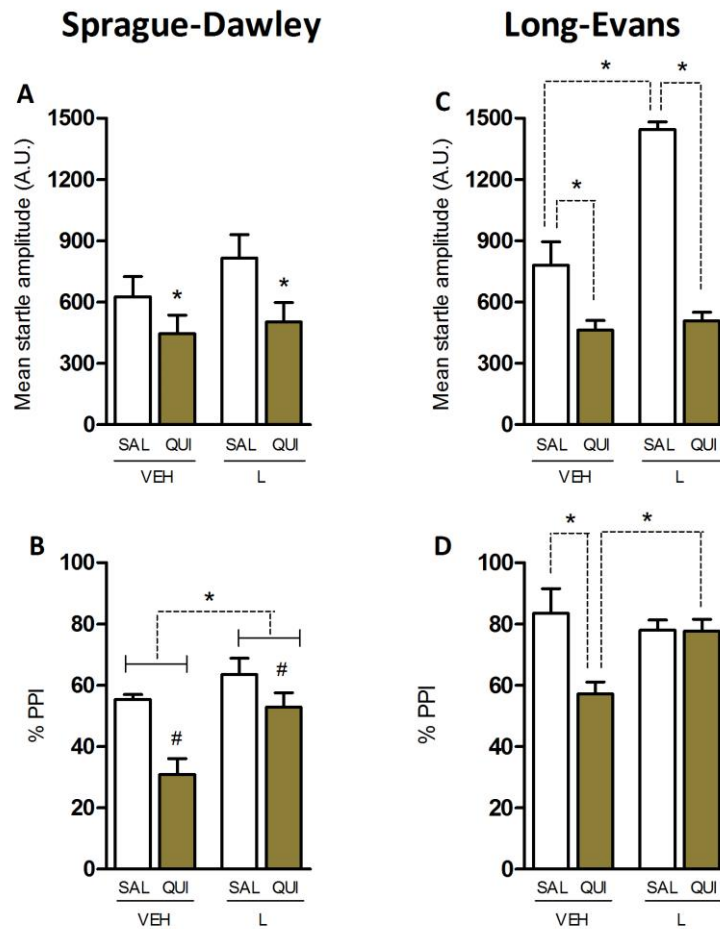


**Fig. 8** Rappresentazione grafica dell'effetto dell'agonista parziale  $D_1$  SKF38393 sulla startle (in alto) e sulla PPI (in basso) nei ratti SD (5 e 10  $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ), WIS e LE (10  $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ). Gli istogrammi rappresentano le medie  $\pm$ SEM ottenute per ogni gruppo sperimentale.

## 4.2 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEGLI AGONISTI RECETTORIALI $D_2$ NEI RATTI SPRAGUE-DAWLEY E LONG-EVANS

L'agonista recettoriale  $D_2$  quinpirolo ha provocato una significativa diminuzione dell'ampiezza della risposta di startle nei ratti SD [ $F(1,36) = 48,51$ ;  $p < 0,05$ ], ma l'effetto non è contrastato dall'antagonista per lo stesso recettore L741626 (Fig. 8). Sia il quinpirolo [ $F(1,36) = 14,88$ ;  $p < 0,05$ ] sia l'L741626 [ $F(1,36) = 10,12$ ;  $p < 0,05$ ] procurano un *main effect* a carico della PPI, riducendola, ma non è riscontrata una loro interazione. L'interazione tra i farmaci [ $F(1,28) = 6,8$ ;  $p < 0,05$ ] è invece riscontrabile dai test sui ratti LE e le analisi *post hoc* rivelano che la risposta del riflesso di startle è aumentata dall'L741626, ma abbassata dal quinpirolo (Fig. 9). L'interazione tra i due farmaci è riscontrabile anche nella risposta di PPI

[ $F(1,28) = 8,07$ ;  $p < 0,05$ ]. Secondo le analisi *post hoc*, il quinpirolo produce un significativo deficit di PPI che viene completamente sanato dall'L741626.

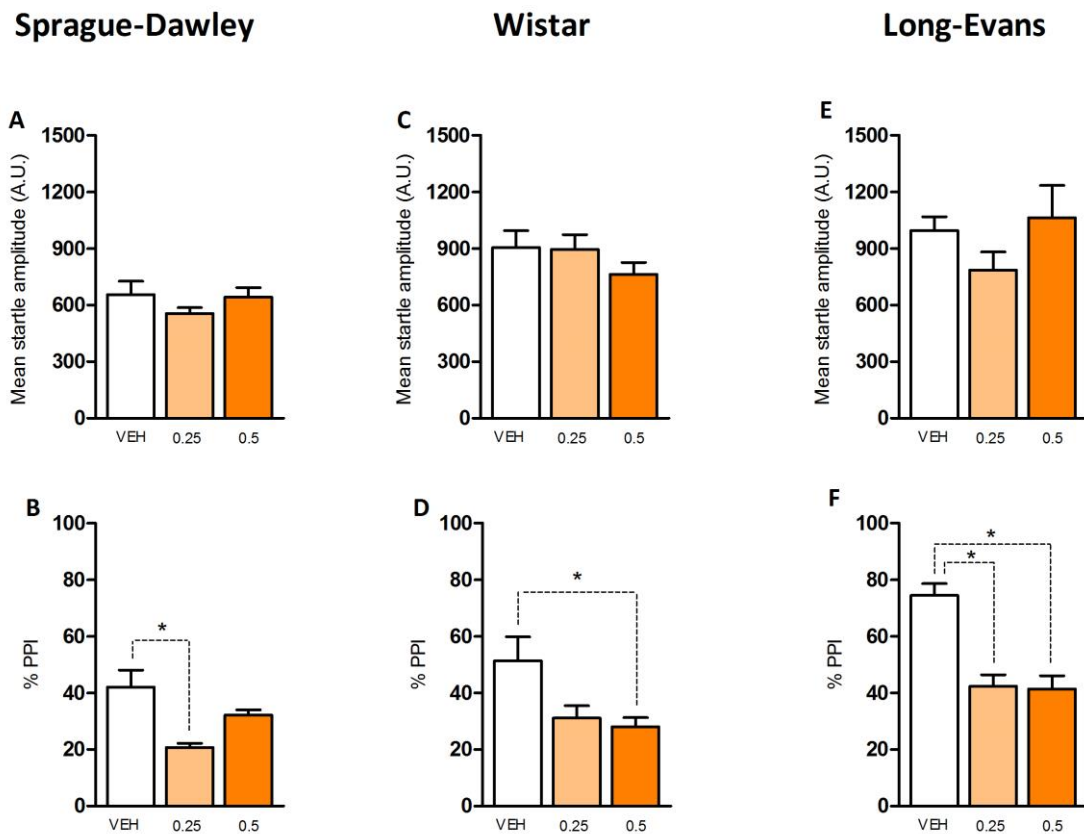


**Fig. 9** Rappresentazione grafica dell'effetto del pre-trattamento con l'antagonista D<sub>2</sub> L741626 sulla startle (in alto) e sulla PPI (in basso) nei ratti SD e LE trattati con quinpirolo (QUI) o il suo veicolo (VEH). Gli istogrammi rappresentano le medie  $\pm$ SEM ottenute per ogni gruppo sperimentale. \* $p < 0,05$ .

### 4.3 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DELL'APOMORFINA NEI RATTI SPRAGUE-DAWLEY, WISTAR E LONG-EVANS

Nei ratti SD ( $n = 10$  per gruppo), l'ampiezza della risposta di startle non ha subito conseguenze in seguito a somministrazione di apomorfina a entrambe le dosi testate (s.c., 0,25 e 0,5  $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ), ma ha provocato *disruption* della PPI alla dose piú bassa [ $F(2,27) = 5,09$ ;  $p < 0,05$ ] (Fig. 10). Nei ratti WIS ( $n = 10$  per gruppo), stesso risultato è stato ottenuto per

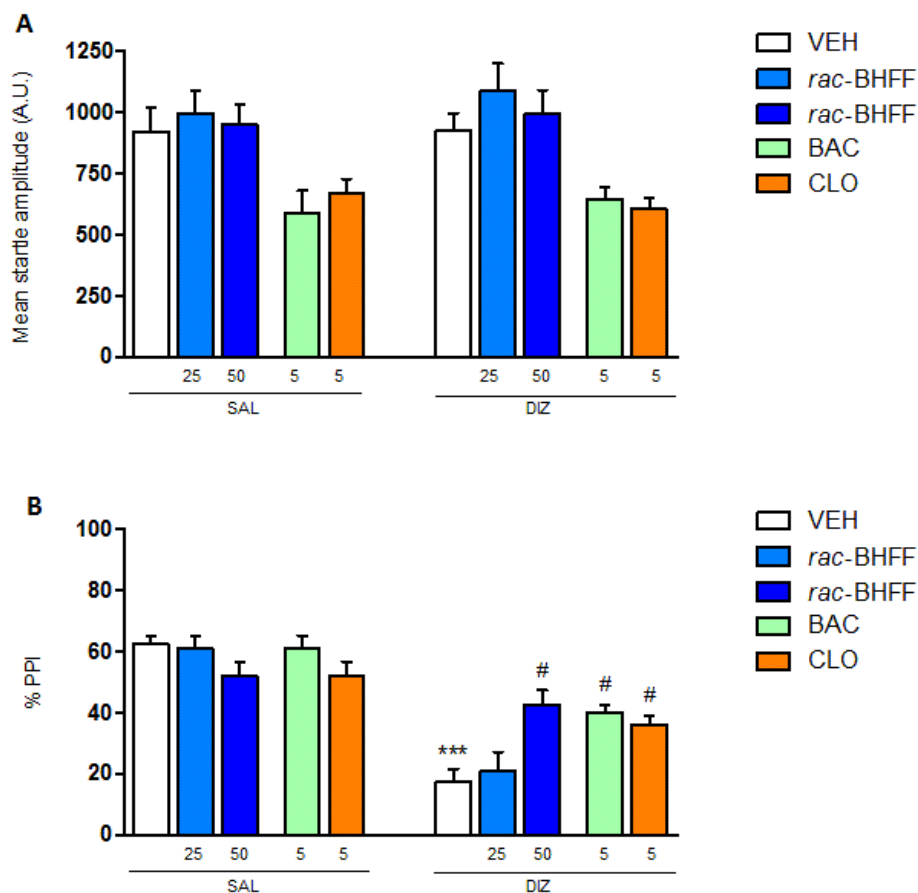
quanto riguarda la risposta di startle, mentre solo la dose più alta di apomorfina è risultata efficace per ottenere una diminuzione di PPI [ $F(2,27) = 4,25$ ;  $p < 0,05$ ]. Infine, nei ratti LE ( $n = 10-12$  per gruppo), la risposta di startle rimane inalterata, mentre la PPI viene pesantemente abbattuta [ $F(2,32) = 13,27$ ;  $p < 0,05$ ] da entrambe le dosi di apomorfina somministrate.



**Fig. 10** Rappresentazione grafica dell'effetto dell'agonista dopaminergico non selettivo apomorfina alle dosi di 0,25 e 0,5 mg·Kg<sup>-1</sup> sulle risposte di startle (in alto) e PPI (in basso) in ratti appartenenti ai tre ceppi (SD, WIS e LE). Gli istogrammi rappresentano le medie  $\pm$ SEM ottenute per ogni gruppo sperimentale. \* $p < 0,05$ .

#### 4.4 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEL *rac*-BHFF NEI RATTI SPRAGUE-DAWLEY

Nella serie di esperimenti che apre lo studio ai PAM GABA<sub>B</sub> come possibili agenti antipsicotici, abbiamo valutato l'effetto del *rac*-BHFF (p.o., 25 e 50 mg·Kg<sup>-1</sup>) sulla diminuzione di PPI indotta dalla dizicilpina (s.c., 0,1 mg·Kg<sup>-1</sup>) (Fig. 11).



**Fig. 11** Rappresentazione grafica dell'effetto dovuto alla somministrazione della dizocilpina (DIZ) in combinazione con il *rac*-BHFF a due diverse dosi (25 e 50 mg·Kg<sup>-1</sup>), con il baclofen (BAC; 5 mg·Kg<sup>-1</sup>) e con la clozapina (CLO; 5 mg·Kg<sup>-1</sup>) in ratti SD. Gli istogrammi rappresentano le medie ±SEM ottenute per ogni gruppo sperimentale. \*\*\*p < 0,001; # < 0,05.

Nei ratti SD pretrattati con il *rac*-BHFF (60 minuti prima dell'iniezione con dizocilpina) non si sono osservate differenze fra i gruppi sperimentali nella risposta di startle alle dosi del farmaco di 25 e 50 mg·Kg<sup>-1</sup>. Per ciò che riguarda la risposta di PPI, l'analisi statistica ha messo in luce un'interazione [F(2,47) = 4,62; p < 0,05] fra i gruppi, evidenziando un effetto significativo relativo alla dose più alta del *rac*-BHFF che ha efficacemente contrastato il deficit di PPI causato dalla dizocilpina.

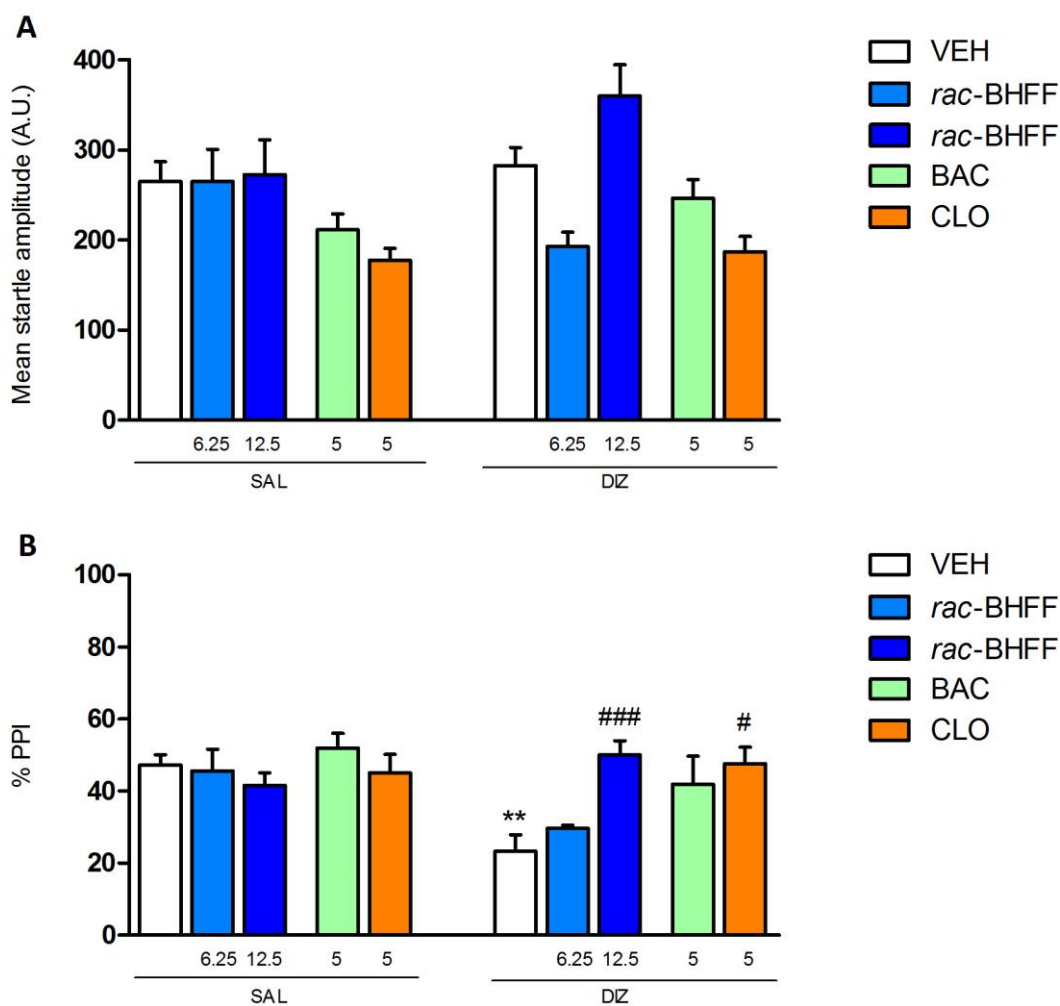
A differenza del suo analogo, il baclofen (i.p., 5 mg·Kg<sup>-1</sup>) ha prodotto una significativa diminuzione della startle [*main effect*: F(1,37) = 9,44; p < 0,01], ma anche un aumento della risposta di PPI, contrastando l'effetto deficitario della dizocilpina [F(1,37) = 4,89; p < 0,05]. La

somministrazione di clozapina (i.p., 5 mg·Kg<sup>-1</sup>) ha avuto degli effetti simili [*main effect*:  $F(1,37) = 5,27$ ;  $p < 0,05$ ] sia sulla risposta di startle sia sulla risposta di PPI, che è stata contrastata in modo efficace.

#### **4.5 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEL *rac*-BHFF NEI TOPI C57BL/6J**

Gli effetti della somministrazione di *rac*-BHFF (p.o., 6,25-12,5 mg·Kg<sup>-1</sup>) sulla *disruption* di PPI ottenuta con la dizocilpina nei topi del ceppo C57BL/6J rispecchiano quelli osservati nei ratti SD (Fig. 12). Nessuna differenza fra i gruppi è emersa nella risposta di startle, ma, anche in questo caso, osserviamo una marcata interazione fra pretrattamento e trattamento [ $F(2,52) = 5,32$ ;  $p < 0,01$ ]. Nello specifico, gli effetti della dizocilpina sulla PPI sono stati contrastati dal *rac*-BHFF, somministrato ai topi in dose di 12,5 mg·Kg<sup>-1</sup>. Il trattamento dei topi con la dizocilpina in combinazione con il baclofen (i.p., 5 mg·Kg<sup>-1</sup>) non si è rivelato statisticamente significativo sulla risposta di startle, rilevando soltanto i *main effects* di dizocilpina e baclofen sulla PPI. La clozapina (i.p., 5 mg·Kg<sup>-1</sup>) ha avuto un effetto principale sulla risposta di startle, riducendone l'ampiezza [ $F(1,41) = 7,84$ ;  $p < 0,01$ ], e un effetto contrastante la *disruption* della PPI indotta dalla dizocilpina [ $F(1,41) = 4,81$ ;  $p < 0,05$ ].



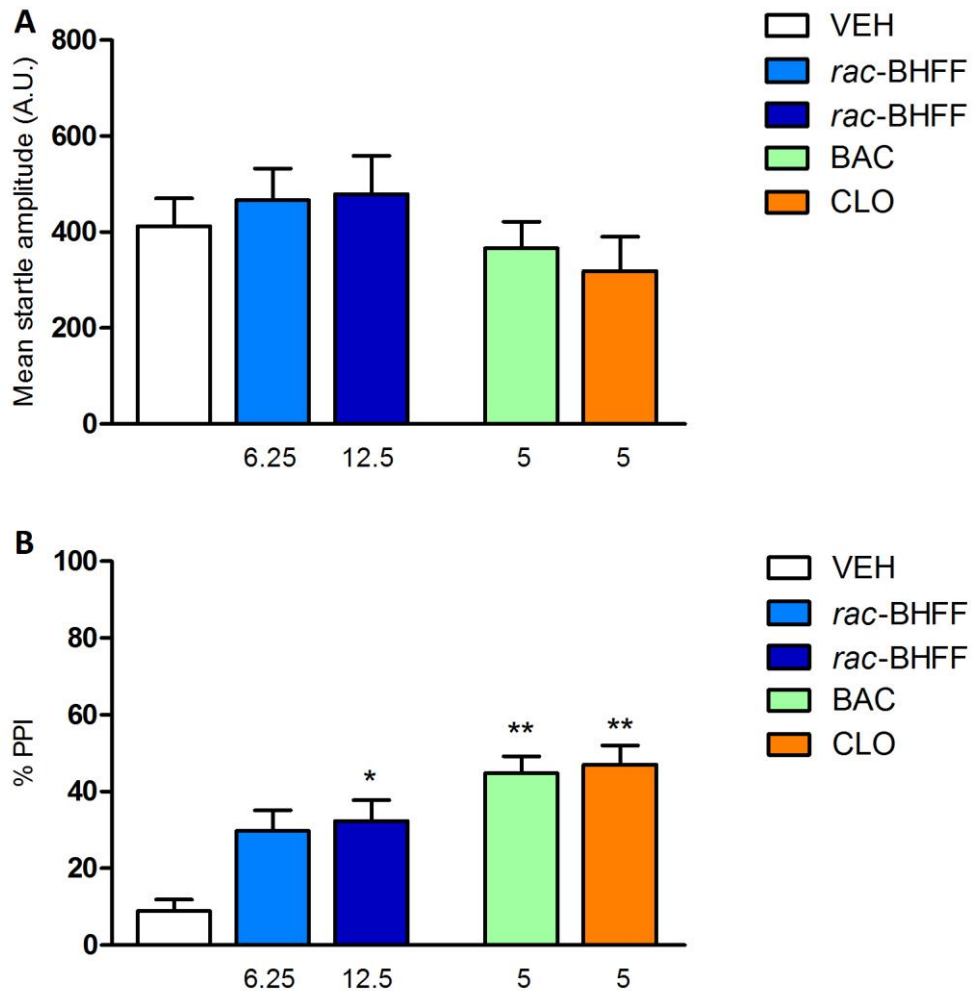


**Fig. 12** Rappresentazione grafica dell'effetto dovuto alla somministrazione della dizocilpina (DIZ) in combinazione con il *rac*-BHFF a due diverse dosi (6,25 e 12,5 mg·Kg<sup>-1</sup>), con il baclofen (BAC; 5 mg·Kg<sup>-1</sup>) e con la clozapina (CLO; 5 mg·Kg<sup>-1</sup>) in topi C57BL/6J. Gli istogrammi rappresentano le medie  $\pm$ SEM ottenute per ogni gruppo sperimentale. <sup>###</sup> $p < 0,001$ ; <sup>#</sup> $p < 0,05$ ; <sup>\*\*</sup> $p < 0,01$ .

#### 4.6 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEL *rac*-BHFF NEI TOPI DBA/2J

Il potenziale antipsicotico del *rac*-BHFF è stato testato anche in un ceppo di topi (DBA/2J) che manifesta deficit di PPI in maniera spontanea (Fig. 13). Gli animali sono stati trattati con il *rac*-BHFF (p.o., 6,25-12,5 mg·Kg<sup>-1</sup>) o il suo veicolo e, dopo 60 minuti, sono stati sottoposti al test della PPI. La risposta di startle non ha subito variazioni in seguito al trattamento con entrambe le dosi di *rac*-BHFF, ma la risposta di PPI è stata migliorata in questo ceppo di topi

[ $F(2,35) = 4,63$ ;  $p < 0,05$ ]. Le analisi statistiche *post hoc* hanno evidenziato che la dose efficace per contrastare il deficit di PPI è stata quella di  $12,5 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ . Sia il baclofen sia la clozapina non hanno avuto effetti sulla risposta di startle, mentre entrambi hanno contrastato in modo efficace il deficit di PPI intrinseco di questo ceppo di topi [BAC:  $F(1,20) = 10,28$ ;  $p < 0,01$ ; CLO:  $F(1,20) = 12,36$ ;  $p < 0,01$ ].



**Fig. 13** Rappresentazione grafica dell'effetto dovuto alla somministrazione del *rac*-BHFF a due diverse dosi ( $6,25$  e  $12,5 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ), con il baclofen (BAC;  $5 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ) e con la clozapina (CLO;  $5 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ) in topi DBA/2J. Gli istogrammi rappresentano le medie  $\pm$ SEM ottenute per ogni gruppo sperimentale. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

## 5 DISCUSSIONE

La principale osservazione che possiamo fare sulla base dei risultati ottenuti, è che, a differenza dei ratti albinici (SD e WIS), il sensorimotor gating nei ratti del ceppo LE è significativamente influenzato dalla stimolazione dei recettori dopaminergici D<sub>1</sub> per mezzo di agonisti puri, nel nostro caso dell'SKF82958. La riduzione di PPI suscitata in tal modo nei ratti LE, non è accompagnata da una riduzione della risposta di startle ed è efficacemente contrastata dalla somministrazione di antagonisti D<sub>1</sub>, ma non di antagonisti D<sub>2</sub>. Gli agonisti parziali D<sub>1</sub>, i.e. SKF38393, non producono la medesima risposta in questo ceppo di ratti.

I risultati prodotti dal presente studio sono tra i primi che riportano un deficit di PPI nei ratti avvenuto in conseguenza alla selettiva e indipendente stimolazione dei recettori D<sub>1</sub>. Infatti, le ricerche effettuate finora in questo campo hanno sempre attribuito un ruolo secondario ai recettori D<sub>1</sub> sulla regolazione del sensorimotor gating, dal momento che gli esperimenti condotti sui ratti dei ceppi albinici dimostravano un coinvolgimento di questi recettori subordinato ai D<sub>2</sub>, considerati i veri e propri fattori della perdita della PPI. Come indicano numerosi studi sulle proprietà di indurre perdite del gating degli agonisti dopaminergici non selettivi nei ratti SD, WIS e LE, i recettori D<sub>1</sub> sembrano, piuttosto, potenziare l'azione degli agonisti D<sub>2</sub> e degli antagonisti NMDA. Infatti, essi non sono in grado di provocare la diminuzione della funzione di PPI in modo selettivo. Per esempio, i deficit di PPI evocati nei ratti SD dalla somministrazione dell'agonista puro D<sub>1</sub> SKF82958 e così dei suoi analoghi, sono in realtà attribuiti alla stimolazione dei recettori D<sub>2</sub>. In accordo con questa ipotesi, dai nostri risultati si osserva che il deficit di PPI indotto dall'agonista D<sub>1</sub> SKF82958, è contrastato dalla somministrazione dell'antagonista D<sub>2</sub> L741626, e non dall'antagonista D<sub>1</sub> SCH23390. I relativi contributi dei due sottotipi recettoriali alla disfunzione della PPI ancora non è chiarito completamente, ma le prove raccolte portano a pensare a un coinvolgimento dei recettori D<sub>1</sub> nel meccanismo regolatorio. Gli agonisti dopaminergici non selettivi esercitano la loro azione,

principalmente, nel nucleo accumbens dove la specifica localizzazione dei recettori D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> non è conosciuta.

La regolazione della PPI nei ratti SD e LE, potrebbe dipendere da differenti influenze della dopamina a livello del nucleo accumbens, sul quale gli agonisti dopaminergici non selettivi esercitano la loro azione. Azione che potrebbe essere contrastata dalla stimolazione di altri recettori D<sub>1</sub> localizzati nella corteccia prefrontale, da cui arriverebbero input contrapposti.

Se da un lato l'agonista puro SKF82958 è stato efficace a causare i deficit di PPI, dall'altro, l'agonista parziale SKF38393 ha fallito in questo tentativo. L'incapacità della molecola di causare tali deficit sarebbe dovuta alla sua scarsa efficacia di attivare l'adenilato ciclasi accoppiata ai recettori D<sub>1</sub> che corrisponde al 50-70 % dell'efficacia della dopamina ed è molto più bassa di quella posseduta da altri agonisti puri come l'SKF82958. Le differenze tra le due benzazepine nei ratti sono riscontrabili anche dagli *outcomes* fenotipici osservati dopo somministrazione dell'una, ma non dell'altra: lo stesso meccanismo interverrebbe nelle manifestazioni deficitarie di PPI, sollecitate solo dall'attivazione completa del recettore.

Studi genetici e farmacologici hanno evidenziato una funzione cruciale dei recettori D<sub>1</sub> nella modulazione del segnale dopaminergico nei topi. Inizialmente, esisteva una forte dicotomia fra ratti e topi sulla regolazione del sensorimotor gating, ma recenti evidenze riportano l'avvenuta *disruption* in ceppi di topi non comunemente utilizzati per gli esperimenti di laboratorio dopo somministrazione di agonisti dopaminergici D<sub>2</sub>. Questo risultato prova che, almeno sotto specifiche condizioni sperimentali, nei ratti e nei topi, la PPI è regolata in modo indipendente sia dai recettori D<sub>1</sub> che dai D<sub>2</sub> e che le variazioni tra i diversi ceppi delle due specie di roditori hanno una forte rilevanza nel contributo di ogni tipo recettoriale. In linea con questa conclusione e con i risultati di questo studio, precedenti ricerche hanno dimostrato che esiste una differenza in funzione del *background* genetico nei ratti che conferirebbe una diversa regolazione della reattività alla risposta di startle e alla PPI da parte del sistema dopaminergico.

Abbiamo dimostrato che, mentre l'SKF82958 non influenza la risposta di startle in nessuno dei ceppi di ratti, l'SCH23390 si comporta in modo opposto, intaccando l'ampiezza della risposta del riflesso. Questo parametro subisce una lieve diminuzione nei ratti albini, mentre

nei ratti LE si riscontra un suo aumento. La spiegazione del comportamento divergente in risposta al farmaco potrebbe risiedere proprio in una diversa regolazione da parte del sistema dopaminergico nei ratti LE.

Nei ratti albinici, il difetto dell'enzima tirosinasi, che causa una minore produzione di melanina, porta anche ad una diminuzione dell'attività enzimatica per la sintesi della dopamina (la tirosina idrossilasi) e del suo precursore L-DOPA. Infatti, in questi ratti si è riscontrato un minor turnover della dopamina, che risulta invece attivamente metabolizzata nei ratti LE. Inoltre, la pigmentazione sarebbe inversamente correlata con gli effetti indotti dall'apomorfina sulla PPI, indicando una relazione esistente fra tirosinasi e recettori dopaminergici, i quali sarebbero direttamente influenzati proprio dai vari gradi di attività tirosinasi.

È di dovere ricordare che gli effetti di diminuzione della PPI ottenuti sui ratti LE sono stati osservati nelle nostre condizioni sperimentali e con l'utilizzo del nostro protocollo. Infatti, a seconda dell'intensità degli stimoli acustici, del rumore di fondo, della durata degli intervalli prestimolo-stimolo o stimolo-stimolo, come anche della regolazione della piastra accelerometrica, la risposta di startle e la PPI subiscono notevoli fluttuazioni. Per esempio, un intervallo prestimolo-stimolo di 120 ms evoca una PPI di base dell'80 % nei ratti LE che diminuisce fino a circa il 60 % dopo somministrazione dell'agonista puro  $D_1$  SKF81927. Se l'intervallo prestimolo-stimolo viene accorciato, la stimolazione del recettore  $D_1$  non permette di osservare la stessa risposta comportamentale, anzi, la PPI viene addirittura aumentata. Anche i valori di PPI di base contribuiscono a mettere in luce eventuali effetti di un farmaco sulla PPI che, insieme a un opportuno protocollo sperimentale, risulta ottimale per mettere in luce l'effetto biologico ricercato.

I dati di questo studio confermano la sensibilità dei ratti LE agli effetti degli agonisti  $D_1$ : in seguito alla stimolazione di questo recettore, tramite la somministrazione di quinpirolo, si ottiene la diminuzione di PPI che è selettivamente portata a livelli fisiologici dall'antagonista  $D_2$  L741626. Anche l'agonista non selettivo apomorfina produce le stesse conseguenze in tutti e tre i ceppi. Tuttavia, sebbene anche i ratti SD e WIS abbiano subito un peggioramento del sensorimotor gating in seguito a somministrazione degli stessi agonisti dopaminergici,

l'effetto non è contrastato dagli antagonisti D<sub>1</sub>, come invece accade nei ratti LE, nei quali la disruption è corretta dall'antagonista D<sub>1</sub> SCH23390. Viceversa, i ratti albini risultano sensibili all'antagonismo esercitato dagli antagonisti D<sub>2</sub> (L741626) che riportano a valori normali la PPI in seguito a disruption da parte di agonisti D<sub>1</sub>. Questo risultato, ancora una volta, suggerisce un ruolo prominente dei recettori D<sub>2</sub> nella regolazione della PPI.

Nell'introduzione di questa tesi è stata sottolineata l'importanza della PPI come strumento diagnostico per la misurazione del sensorimotor gating, i cui deficit sono riconosciuti in malattie psichiatriche come la schizofrenia e la sindrome di Tourette. È interessante considerare che proprio i recettori dopaminergici D<sub>1</sub> sono stati riconosciuti tra i substrati patofisiologici in entrambi questi disturbi: nella schizofrenia, essi sono implicati nell'insorgenza dei sintomi negativi e dei deficit cognitivi, mentre nella malattia di Tourette, l'antagonismo dei recettori D<sub>1</sub> ne riduce la gravità dei sintomi (diminuzione dei tic).

L'identificazione del contributo dei recettori D<sub>1</sub> sulla modulazione della funzione di gating in una modalità strettamente dipendente dal ceppo permette di ipotizzare l'esistenza di specifiche interazioni fra questo sottotipo recettoriale e fattori genetici nella patofisiologia della schizofrenia e malattia di Tourette.

È stato già argomentato il ruolo primario della corteccia prefrontale nelle funzioni neurocognitive e il suo coinvolgimento nell'insorgenza, soprattutto, dei sintomi negativi della schizofrenia. Un'anormale trasmissione o elaborazione dei segnali da parte dei neuroni glutammatergici, estremamente rappresentati in corteccia, potrebbe costituire una valida integrazione della teoria dopaminergica della schizofrenia. Infatti, come abbiamo visto, sia la dizocilpina sia la PCP provocano effetti simil-psicotici, compresa la diminuzione della PPI. Tuttavia, il meccanismo attraverso il quale gli antagonisti NMDA intaccano le funzioni di gating non è stato ancora chiarito, ma un ruolo chiave è attribuito proprio alle disfunzioni dei neuroni glutammatergici e dopaminergici della corteccia e delle aree ippocampali. A livello di queste regioni, la dizocilpina e la PCP agiscono stimolando il rilascio di glutammato, il quale, in quantità non fisiologiche, produrrebbe le alterazioni neurocognitive tipiche dei disturbi psicotici e iperattività comportamentale.

Gli esperimenti di PPI condotti testando il *rac*-BHFF sui ratti SD e sui ceppi di topi C57BL/6J e DAB/2J, ci hanno permesso di evidenziare un ruolo cruciale dei neuroni glutammatergici. Questi ultimi infatti, sono modulati attraverso la stimolazione dei recettori GABA<sub>B</sub> espressi a livello pre- e post-sinaptico, che influirebbero sulla segnalazione: la disruption di PPI indotta da antagonisti NMDA (quali MK801 e PCP) è contrastata dal baclofen, capostipite dei PAM GABA<sub>B</sub>. Il baclofen, dunque, esprimendo un effetto non dissimile da quello dell'antipsicotico atipico clozapina, potrebbe costituire un agente farmacologico da utilizzare nella terapia della schizofrenia, ma gli importanti effetti secondari recati dal farmaco ne limita notevolmente l'impiego in ambito clinico. Il *rac*-BHFF, così come il baclofen, agirebbe in modo da contrastare la disinibizione dell'attività neuronale causata da un rilascio esagerato di glutammato in seguito ad attivazione del recettore NMDA, in queste aree. In alternativa, il *rac*-BHFF sarebbe in grado di contrastare il deficit di PPI indotto dalla dizocilpina agendo sui recettori GABA<sub>B</sub> dei nuclei subcorticali, i quali rappresentano l'interfaccia tra regioni corticali e il ponte e implicati nella regolazione della PPI.

## Seconda parte

Il comportamento aggressivo patologico è un fenotipo ricorrente in numerosi disturbi neuropsichiatrici come quello ossessivo compulsivo (OSD), bipolare, post-traumatico da stress, il deficit di attenzione e iperattività (ADHD), epilessia, autismo, abuso di sostanze stupefacenti e schizofrenia. La componente aggressiva della sfera emozionale e affettiva compromessa in queste sindromi non è studiata in modo sufficiente principalmente a causa della mancanza di modelli animali adeguati (Kudryavtseva, 2014). Un significativo contributo è dato dagli studi genetici, che sono stati determinanti per identificare la componente eziologica della familiarità nella malattia. Allo stesso modo, le numerose meta-analisi hanno messo in luce la correlazione fra il particolare genotipo e la storia familiare dei soggetti (interazione genotipo-ambiente). Nonostante la grande attenzione riposta dalla comunità scientifica sul problema, le concause, nella maggior parte dei casi, risultano essere esaminate singolarmente, perdendo la possibilità di apprezzare eventuali interazioni tra i fattori di rischio.

L'oggetto principale della seconda parte della mia tesi è l'introduzione di un nuovo modello animale del fenotipo aggressivo che riproduce le intercorrelazioni esistenti fra genotipo e ambiente (e genere) che sono segnalate come fattori eziologici critici nell'insorgenza delle malattie neuropsichiatriche citate finora. Il modello, tra i primi nel suo genere, è fornito da una linea di topi ipomorfici per l'enzima MAO-A (MAO-A<sup>Neo</sup>) che si distingue per manifestazioni comportamentali molto simili a quelle esibite da altri modelli animali farmacologici di schizofrenia, come i deficit di PPI. Inoltre, i topi MAO-A<sup>Neo</sup>, a differenza di altri modelli, possiedono una caratteristica comportamentale aggiuntiva che li colloca all'interno del fenotipo aggressivo. Questa linea di topi manifesta similitudini comportamentali con i topi MAO-A Knock out (sAKO), caratterizzata da intrinseci comportamenti reattivi aggressivi, riconducibili alla completa inattività dell'enzima MAO-A.



Quindi, i primi passaggi per la caratterizzazione fenotipica del modello animale murino MAO-A<sup>Neo</sup> sono stati:

- studiare il riflesso di gating e la PPI;
- valutare la sensibilità all'antagonista NMDA dizocilpina (MK801) in PPI;
- testarli da un punto di vista comportamentale.

Questi ultimi esperimenti ci hanno permesso di inquadrare i topi MAO-A<sup>Neo</sup> come fenotipo aggressivo.

## 6 METODI

### 6.1 ANIMALI

Per questa seconda parte del lavoro sono stati utilizzati topi maschi (25-30 g) del ceppo 129S6 (WT), topi maschi MAO-A<sup>Neo</sup> e sAKO (MAO-A<sup>A863T</sup>) geneticamente modificati, derivanti dal ceppo 129S6.

Le condizioni di stabulazione sono simili a quelle descritte nella prima parte della tesi, fatta eccezione per gli animali che dovevano essere sottoposti al test comportamentale, per i quali sono stati adottati criteri di stabulazione compatibili con le precondizioni richieste per la validazione del test.

### 6.2 APPARATI E PROCEDURE SPERIMENTALI

Gli esperimenti di PPI sono stati condotti utilizzando il sistema Startle Reflex secondo le modalità e il protocollo descritti nella prima parte della tesi (par 3.2). Le impostazioni della macchina per il rilevamento del riflesso di startle e della PPI riprendono quelle precedentemente descritte (par 3.2.10) per i test sui topi.

Per analizzare le caratteristiche comportamentali della linea di topi MAO-A<sup>Neo</sup> mi sono servita del test del resident-intruder, che mi ha consentito di “misurare” l’aggressività degli animali.

Il test del resident-intruder consiste nell’osservazione del comportamento di un animale (chiamato *resident*), sottoposto a un breve periodo di isolamento sociale, durante l’interazione con un altro animale (chiamato *intruder*) di stesso sesso, età, taglia, per valutarne l’aggressività. Quest’ultimo, a differenza del *resident*, non subisce isolamento sociale. L’isolamento, di durata variabile, costituisce un passaggio fondamentale per la riuscita dell’esperimento, poiché è necessario intervenire con un paradigma di natura ambientale per poter osservare questo tipo di comportamento. Esso ha la funzione di stimolare la territorialità dell’animale e aumentarne, di conseguenza, l’aggressività. Sebbene

esistano numerosi ceppi di topi intrinsecamente aggressivi, come per esempio i MAO-A Knock out (sAKO), per cui, comunque, si è intervenuto con manipolazioni genetiche (Scott, 2008), il livello di aggressività degli animali di laboratorio è relativamente basso. Il topo comune (*Mus musculus*), come altri animali che vivono allo stato selvatico, ricorre al comportamento aggressivo istintivamente, per difendere il proprio territorio e la posizione gerarchica, per il cibo, per fini riproduttivi e difesa della prole. Nelle condizioni ambientali in cui sono allevati i topi di laboratorio, l'aggressività ha scarse ragioni di manifestarsi. Infatti, dopo numerose generazioni ottenute dagli incroci dei ceppi più usati, questi animali sono stati resi docili e mansueti, forse non intenzionalmente, dalla selezione per la manipolazione da parte dell'uomo (Freudenberg, 2015).

La *maternal separation* (MS), già descritta come modello ambientale di schizofrenia, è stato il paradigma che mi ha permesso di simulare lo stress psicosociale perinatale nei topi MAO-A<sup>Neo</sup> e nei topi WT, usati come genotipo di controllo.

### **6.2.1 Maternal separation**

I neonati maschi MAO-A<sup>Neo</sup> e WT (*pups*) sono stati sottoposti al paradigma della MS nel periodo di vita compreso tra il primo e l'ottavo giorno dopo la nascita (PND 1 - PND 8), per tre ore al giorno. Durante la separazione giornaliera, i *pups* subivano, come stress aggiuntivo, una iniezione intraperitoneale di soluzione salina per la quale è stato utilizzato un ago molto fine (30 G) opportunamente montato su una siringa (Hamilton). Al termine delle tre ore, i *pups* venivano ritrasferiti nella gabbia con la madre ed, eventualmente, con il resto della cucciolata composto da topi femmina, che non subivano la MS.

Dopo il periodo PND 1 - PND 8, i cuccioli venivano lasciati indisturbati fino allo svezzamento ( $\approx$  PND 23) e quindi trasferiti in una gabbia diversa insieme ai coetanei maschi ( $n = 4-5$  per gabbia).

### **6.2.2 Resident-intruder**

Il test del *resident-intruder* è stato condotto su topi maschi MAO-A<sup>Neo</sup> e WT di 2-3 mesi d'età e di 25-30 g di peso, dopo un periodo di isolamento di 14 giorni. Come dimostrato da precedenti studi effettuati nei nostri laboratori, la scelta della durata dell'isolamento si è rivelata sufficiente per evocare una risposta aggressiva da parte dei MAO-A<sup>Neo</sup>. Prima del test, ogni topo, all'interno della propria gabbia, è stato lasciato nella stanza allestita per la sessione sperimentale, mantenuta in condizioni di luminosità di 10 lux e con un rumore di fondo di 70 dB. Dopo 30 minuti di abituamento ha avuto luogo il test della durata di 5 minuti, durante i quali ogni topo MAO-A<sup>Neo</sup> è stato esposto per la prima volta all'interazione con un conspecifico WT, precedentemente messo in abituamento nella stessa stanza. La sessione sperimentale è stata monitorata da una stanza adiacente e videoregistrata per l'analisi *offline* mediante l'utilizzo dell'apposito programma per l'analisi comportamentale (Behavior Tracker).

L'analisi del comportamento aggressivo include la conta e la misurazione (*scoring*) dei seguenti parametri:

latenza all'attacco (s),

numero degli episodi aggressivi (morsi, combattimenti),

durata degli episodi aggressivi (s).

### **6.2.3 Farmaci**

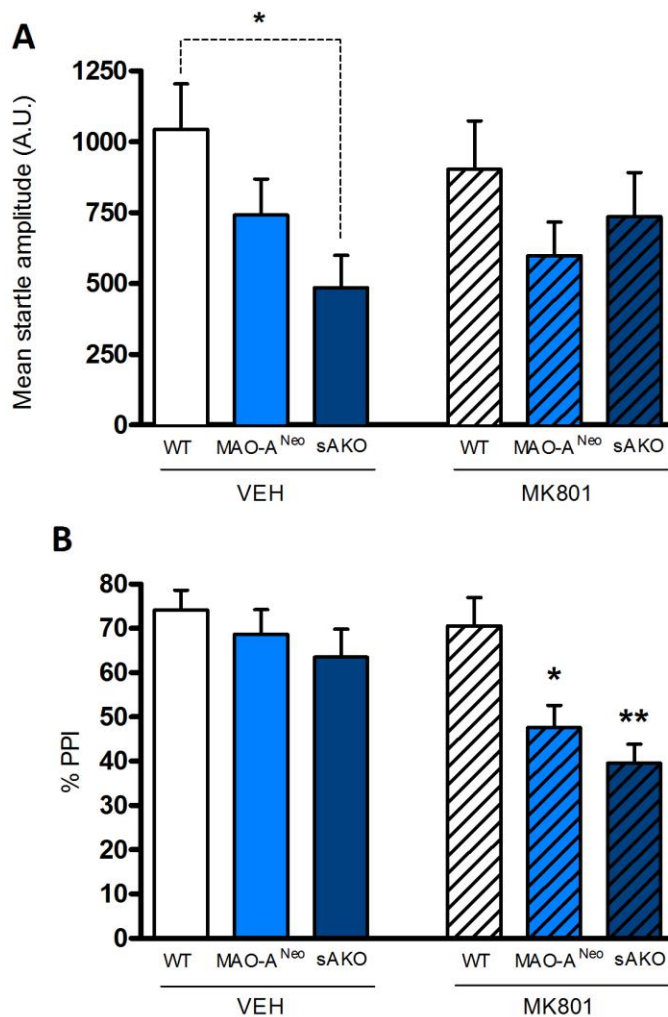
Per gli esperimenti di PPI sui topi MAO-A<sup>Neo</sup> e WT abbiamo utilizzato la dizocilpina (MK801, Sigma-Aldrich) solubilizzata con soluzione salina (9 %) e somministrata i.p. in un volume di iniezione di 10 ml·Kg<sup>-1</sup>.

## 7 RISULTATI

### 7.1 EFFETTO DELLA DIZOCILPINA SUI PARAMETRI DI STARTLE E PPI

Gli effetti della dizocilpina (MK801) sui parametri di startle sono stati analizzati tramite ANOVA a due vie, con genotipo (WT, Neo o sAKO) e trattamento (MK o VEH) come fattori. L'analisi statistica ha rilevato un *main effect* del genotipo [ $F(2,38) = 3,37$ ;  $p < 0,05$ ] che indica una significativa riduzione dei valori di startle sia nei MAO-A<sup>Neo</sup> sia negli sAKO, indipendentemente dal trattamento ricevuto. Nessun effetto significativo è stato invece trovato per il trattamento [ $F(1, 38) = 0,008363$ ;  $p = 0,9276$ , NS] e per l'interazione genotipo - trattamento [ $F(2,38) = 1,170$ ;  $p = 0,3214$ , NS] (Fig. 14A).

Le analisi della PPI sono state condotte con lo stesso disegno statistico utilizzato per la startle. Sebbene l'ANOVA non abbia rilevato nessun effetto di interazione [ $F(2, 35) = 1,705$ ;  $p = 0,1965$ , NS], le analisi sul genotipo e sul trattamento hanno prodotto effetti significativi (genotipo: [ $F(2, 35) = 6,646$ ,  $p < 0.01$ ]; trattamento:  $F(1,35) = 12,74$ ;  $p < 0.01$ ). È interessante sottolineare come dosi sotto soglia e inefficaci del farmaco psicotomimetico MK801 nei WT abbiano prodotto una diminuzione significativa in entrambi i genotipi MAO-A carenti (Fig. 14B).

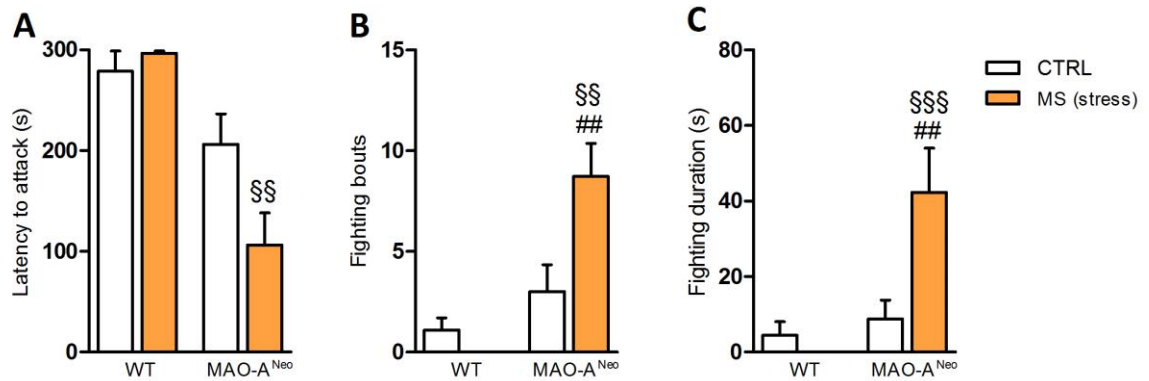


**Fig. 14** Rappresentazione grafica dell'effetto della dizocilpina (MK801) sulla risposta di startle (A) e sulla PPI (B) in topi WT, MAO-A<sup>NeO</sup> e sAKO. Gli istogrammi rappresentano le medie  $\pm$ SEM ottenute per ogni gruppo sperimentale. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

## 7.2 EFFETTO DELLA MS SUI TOPI WT E MAO-A<sup>NeO</sup>

Il test del resident-intruder sui topi adulti ha messo in luce un pesante effetto della MS subita nel primo periodo postnatale (PND 1- PND 8) sul comportamento sociale dei topi MAO-A<sup>NeO</sup> ma non dei loro conspecifici WT. In particolare, i topi WT, indipendentemente dalla manipolazione subita, non manifestano un comportamento aggressivo; viceversa, come rilevato dall'ANOVA, esiste un chiaro effetto dell'interazione genotipo-trattamento per i topi

MAO-A<sup>Neo</sup> che esprimono la loro aggressività attraverso tutti e tre i parametri misurati (Fig. 15A, B, C).



**Fig. 15** Rappresentazione grafica dell'effetto della *maternal separation* [MS (stress)] sui topi WT e MAO-A<sup>neo</sup> sul comportamento aggressivo. I topi che non hanno subito MS sono indicati come gruppo di controllo (CTRL). Sono mostrati i seguenti parametri: Latency to attack (A), Fighting bouts (B) e Fighting duration (C). Gli istogrammi rappresentano le medie  $\pm$ SEM ottenute per ogni gruppo sperimentale. ##p < 0,01; ##p < 0,01; ###p < 0.001.

## 8 DISCUSSIONE

Sia gli esperimenti di PPI sia i test comportamentali mostrano che il difetto genetico a carico della MAO-A, conferisce un particolare fenotipo ai topi carenti per questo enzima. In particolare, i topi sAKO, in cui la delezione *Maoa* è completa, mostrano anomalie nella risposta del riflesso di startle, in condizioni basali, e comportamenti aggressivi intrinseci significativamente più elevati rispetto ai conspecifici WT e MAO-A<sup>Neo</sup>. Questi fenomeni sono generalmente interpretati come il risultato dell'esacerbazione di una condizione di carenza monoaminossidasi, dal momento che gli stessi effetti non si osservano nei topi MAO-A<sup>Neo</sup> ipomorfici per l'enzima (Fig. 14A e B).

La MAO-A è il principale enzima per la degradazione delle amine biogene, con alta affinità per la serotonina e, in misura minore, per la norepinefrina. L'inattività assoluta dell'enzima, dovuta alla mancanza del gene come nei topi sAKO, porta a squilibri neurochimici che si ripercuotono inevitabilmente sui sistemi e sui circuiti regolati da questi neurotrasmettitori.

Nell'uomo, una condizione analoga causata dalla mutazione nonsense del gene *Maoa* produce una serie di anomalie comportamentali riconducibili a una forma grave di disturbo della personalità aggressiva e antisociale accompagnati da lieve ritardo mentale, piromania, ipersessualità, voyeurismo, esibizionismo (Brunner, 1993). Brunner e colleghi, che scoprirono per la prima volta la relazione esistente fra gene per la MAO-A e comportamento aggressivo, riportarono che le alterazioni comportamentali erano accompagnate da una serie di anomalie nelle concentrazioni urinarie dei metaboliti delle monoamine, tra cui la diminuzione del contenuto di acido 5-idrossindolacetico (5-HIAA), acido omovanillico (HVA) e acido vanilmandelico (VMA), e l'aumento dei livelli serotonina (5 volte più alti del normale) e di normetanepinefrina (derivante dal metabolismo della norepinefrina da parte delle COMT (catecol-O-metiltrasferasi). Ad oggi, numerose prove sperimentali confermano un ruolo determinante della MAO A nella reattività emozionale e nel comportamento sociale. La relazione che esiste fra l'attività di questo enzima e l'entità di tali comportamenti è



inversamente proporzionale, per cui a una bassa attività dell'enzima corrisponde una gravità sempre maggiore di queste manifestazioni comportamentali (Bortolato, 2011). Infatti, la totale assenza dell'enzima, ovvero la condizione in cui l'attività enzimatica è nulla, porta ad una personalità borderline, esattamente come quella descritta nella Sindrome di Brunner.

I risultati ottenuti nei test di sensorimotor gating, e soprattutto la risposta di startle, suggeriscono un probabile ruolo delle monoamine in seguito all'aumento della concentrazione cerebrale, in particolare nella corteccia prefrontale, che causerebbe una disfunzione del processo degli stimoli.

Un effetto interessante sulla risposta di startle e sulla PPI, è riscontrabile in seguito a somministrazione di MK801, per il quale i topi appartenenti al genotipo sAKO, a differenza del genotipo MAO-A<sup>Neo</sup> e WT, si mostrano particolarmente sensibili.

I neuroni glutammatergici, in particolare, avrebbero un ruolo principale: la variazione di sensibilità verso l'MK801 sarebbe dovuta probabilmente a uno sbilanciamento della composizione in subunità recettoriali del recettore NMDA. Infatti, diversi studi hanno messo in relazione l'aumento dell'espressione delle subunità recettoriali NR2A e NR2B e la riduzione della N-glicosilazione della subunità NR1 con un aumento di sensibilità agli antagonisti NMDA (Mori, 1995).

Queste modificazioni renderebbero il canale del recettore NMDA meno funzionale, come dimostrato dalla diminuzione della conduttanza ionica e dalle variazioni nei processi di chiusura/apertura del canale (Bortolato, 2012).

Il sequenziamento dei geni per le MAO ha permesso di identificare le numerose varianti alleliche e di capire in che modo esse influenzano la regolazione comportamentale. Fra tutti i polimorfismi genetici, quattro sono stati candidati come potenziali biomarkers o fattori di rischio per lo sviluppo di malattie psichiatriche:

- MAO-A (CA)<sub>n</sub>, la ripetizione di un dinucleotide nell'introne 2;
- VNTR (Variable-Number of Tandem Repeat) di 23 paia di basi vicino all'esone 1;
- Fnu4HI e EcoRV, due frammenti contenenti due siti di restrizione;
- MAO-A-uVNTR, un polimorfismo di VNTR di 30 pb localizzati nel promotore del gene *Maoa*.

I primi tre polimorfismi sono stati associati ad aumentata suscettibilità a numerose condizioni mentali, in particolare è stata trovata una robusta associazione tra il disturbo bipolare e i polimorfismi MAO-A (CA)<sub>n</sub> e VNTR di 23 pb.

Il polimorfismo MAO-A-uVNTR è stato ampiamente studiato e caratterizzato sulla base del differente numero di ripetizioni in tandem, di queste, le ripetizioni di 3 e 4 sequenze nucleotidiche di 30 pb (3R e 4R, rispettivamente) sono le più comuni nella popolazione.

Il genotipo che caratterizza i topi MAO-A<sup>Neo</sup> fornisce un modello altamente isomorfo del polimorfismo MAO-A-uVNTR nell'uomo, e potrebbe rappresentare un modello di schizofrenia con personalità aggressiva. La linea di topi MAO-A<sup>Neo</sup> è stata generata mediante l'inserzione di una cassetta di selezione per la neomicina (Neo<sup>R</sup>) nell'introne 12 e l'inserimento di una sequenza *loxP* nell'introne 11 del gene *Maoa*. Questa particolare configurazione è stata progettata appositamente per produrre una variante genetica nella quale la cassetta di selezione o l'esone 12, che codifica per il sito attivo dell'enzima, è soggetta a rimozione da parte delle ricombinasi (Bortolato, 2011). La presenza della cassetta Neo<sup>R</sup> interferisce con i processi di splicing portando alla produzione di una MAO-A aberrante, con una attività enzimatica pari a circa il 12 % dell'enzima normale.

L'applicazione della MS sui questi topi permette di mettere in luce un insieme di comportamenti aggressivi che evidenziano l'importanza dello stress psicosociale post-natale nell'insorgenza di malattie psichiatriche, o di un particolare cluster, della schizofrenia. Infatti, come rilevato da tutti i parametri misurati del resident intruder (Fig. 15), mentre i topi MAO-A<sup>Neo</sup> non sottoposti alla MS non mostrano comportamenti aggressivi o hanno livelli di aggressività simili a quelli mostrati dai topi WT, i topi con genotipo carente dell'enzima MAO-A risultano significativamente più aggressivi. Nonostante in questo studio non siano disponibili i dati relativi alla funzione di sensorimotor gating degli animali sottoposti a MS, i topi MAO-A<sup>Neo</sup> si sono rivelati degli ottimi modelli per la schizofrenia e soprattutto per lo schizotipo aggressivo. Inoltre, questa indagine sperimentale ci segnala un aspetto molto importante già sottolineato, ovvero l'interazione gene-ambiente. I MAO-A<sup>Neo</sup>, carenti per l'enzima MAO-A, non manifestano alcun segno, nemmeno deficit di startle o PPI, che riconduce ad una particolare anomalia a un disturbo psichiatrico, ma inseriti in un

determinato tipo di ambiente (la MS) sviluppano una costellazione di anomalie comportamentali tipiche dei disturbi psichiatrici schizoaffettivi. Questo fatto è deducibile anche dall'osservazione che i topi WT sottoposti alla MS non manifestano gli stessi *outcomes* comportamentali, come mostrato dall'assenza di episodi aggressivi e dalla latenza all'attacco quasi identica alla durata del test.

## 9 CONCLUSIONI

I deficit di PPI rappresentano una caratteristica endofenotipica di numerosi disturbi neuropsichiatrici, compresa la schizofrenia. Grazie a questa misura operativa, non solo si possono identificare i biomarkers che permettono di riconoscere tali disturbi, ma possono essere individuati i meccanismi biologici e molecolari che sono implicati nella regolazione del sensorimotor gating tramite farmaci che agiscono sui sistemi neurotrasmettitoriali coinvolti. Questo studio ha permesso di confermare un ruolo cruciale dei recettori D<sub>2</sub> sulla regolazione della PPI e un coinvolgimento dei recettori D<sub>1</sub>, in dipendenza dal ceppo di ratti.

In conclusione, con i miei studi ho dimostrato che la PPI, come strumento per lo studio delle patologie neuropsichiatriche e per lo screening dei farmaci, si rivela un ottimo metodo diagnostico traslazionale se adoperato in condizioni controllate e tenendo conto delle variabilità biologiche esistenti fra i diversi ceppi di topi e ratti.



## 10 BIBLIOGRAFIA

Abbruzzese G, Berardelli A (2003) Sensorimotor integration in movement disorders. *Mov Disord* 18: 231-40.

Abel KM, Allin MP, Hemsley DR, Geyer MA (2003) Low dose ketamine increases prepulse inhibition in healthy men. *Neuropharmacology* 44: 729-37.

Andersen ML, Margis R, Frey BN, Giglio LM, Kapczynski F, Tufik S (2009) Electrophysiological correlates of sleep disturbance induced by acute and chronic administration of D-amphetamine *Brain Res* 1249: 162-72.

Angrist B, Sathananthan G, Gershon S (1973) Behavioral effects of L-DOPA in schizophrenic patients. *Psychopharmacology* 31: 1-12.

Arts B, Jabben N, Krabbendam L, van Os J (2009) Meta-analyses of cognitive functioning in euthymic bipolar patients and their first-degree relatives. *Erratum in: Psychol Med* 38: 771-85.

Bakshi VP, Tricklebank M, Neijt HC, Lehmann-Masten V, Geyer MA (1999) Disruption of prepulse inhibition and increases in locomotor activity by competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonists in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 288: 643-52.

Belzung C (2001) Rodent models of anxiety-like behaviors: are they predictive for compounds acting via non-benzodiazepine mechanisms? *Curr Opin Investig Drugs* 2: 1108-11.

Bird ED, Spokes EG, Iversen LL (1979) Increased dopamine concentration in limbic areas of brain from patients dying with schizophrenia. *Brain* 102: 347-60.

Bleich A, Brown SL, Kahn R (1988) The role of serotonin in schizophrenia. *Schizofr Bull* 14: 297-315.

Braff DL, Geyer MA (1990) Sensorimotor gating and schizophrenia. Human and animal model studies. *Arch Gen Psychiatry* 47: 181-188.

Bortolato M, Frau R, Orrù M, Piras AP, Fà M, Tuveri A, Puligheddu M, Gessa GL, Castelli MP, Mereu G, Marrosu F (2007) Activation of GABA<sub>B</sub> receptors reverses spontaneous gating deficits in juvenile DBA/2J mice. *Psychopharmacology (Berl)* 194: 361-9.

Bortolato M, Chen K, Godar SC, Chen G, Wu W, Rebrin I, Farrell MR, Scott AL, Wellman CL, Shih JC (2011) Social deficits and perseverative behaviors, but not overt aggression, in MAO-A hypomorphic mice. *Neuropsychopharmacology* 36: 2674-88.

Bortolato M, Godar SC, Melis M, Soggiu A, Roncada P, Casu A, Flore G, Chen K, Frau R, Urbani A, Castelli MP, Devoto P, Shih JC (2012) NMDARs mediate the role of monoamine oxidase A in pathological aggression. *J Neurosci* 32: 8574-82.

Brunner HG, Nelen MR, van Zandvoort P, Abeling NG, van Gennip AH, Wolters EC, Kuiper MA, Ropers HH, van Oost A (1993) X-linked borderline mental retardation with prominent behavioral disturbance: phenotype, genetic localization, and evidence for disturbed monoamine metabolism. *Am J Hum Genet* 52: 1032-1039.

Buckley P, Citrome L, Nichita C, Vitacco M (2011) Psychopharmacology of aggression in schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin* 37: 930-936.

Crow TJ, Baker HF, Cross AJ (1979) Monoamine mechanisms in chronic schizophrenia: postmortem neurochemical findings. *Br J Psychiatry* 134: 249-256.

Creese I, Burt DR, Snyder SH (1976) Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science* 192: 481-483

Dickinson SL, Curzon G (1983) Role of dopamine and 5-Hydroxytryptamine in stereotyped and non-stereotyped behavior. *Neuropharmacology* 22: 805-812.

Ellenbroek BA, Riva MA (2003) Early maternal deprivation as an animal model for schizophrenia. *Clinical Neuroscience Research* 3: 297-302.

Enticott PG, Ogloff JRP, Bradshaw JL (2008) Response inhibition and impulsivity in schizophrenia. *Psychiatry Research* 157: 251-254.

Fone KC, Porkess MV (2008) Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 32: 1087-102.

Frau R, Bini V, Pillolla G, Malherbe P, Pardu A, Thomas AW, Devoto P, Bortolato M (2014) Positive allosteric modulation of GABA<sub>B</sub> receptors ameliorates sensorimotor gating in rodent models. *CNS Neurosci Ther* 20: 679-84.

Frau R, Abbiati F, Bini V, Casti A, Caruso D, Devoto P, Bortolato M (2015) Targeting neurosteroid synthesis as a therapy for schizophrenia-related alterations induced by early psychosocial stress. *Schizophrenia Research* 168: 640-648.

Freudenberg F, Carreño Gutierrez HC, Post AM, Reif A, Norton WHJ (2015) Aggression in non-human vertebrates: genetic mechanisms and molecular pathways. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* doi: 10.1002/ajmg.b.32358.

Gessa GL, Pani L, Fadda P, Fratta W (1995) Sleep deprivation in the rat: an animal model of mania. *Eur Neuropsychopharmacol* 5: 89-93.

Gould MS, Bird H, Jaramillo BS (1993) Correspondence between statistically derived behavior problem syndromes and child psychiatric diagnoses in a community sample. *J Abnorm Child Psychol* 21: 287-313.

Gould TD, Gottesman II (2006) Psychiatric endophenotypes and the development of valid animal models. *Genes Brain Behav* 5: 113-9.

Hoffman HS, Ison JR (1980) Reflex modification in the domain of startle: I. Some empirical findings and their implications for how the nervous system processes sensory input. *Psychol Rev* 87: 175-89.

Hoptman MJ (2015) Impulsivity and aggression in schizophrenia: a neural circuitry perspective with implications for treatment. *CNS SPECTRUMS* 20: 280-289.

Howland RH (1997) Sleep-onset rapid eye movement periods in neuropsychiatric disorders: implications for the pathophysiology of psychosis. *J Nerv Ment Dis* 185: 730-8.

Hyman SE (2007) Can neuroscience be integrated into the DSM-V? *Nat Rev Neurosci* 8: 725-32.

Kaladjian A, Jeanningros R, Azorin JM, Anton JL, Mazzola- Pomietto P (2011) Impulsivity and neural correlates of response inhibition in schizophrenia. *Psychological Medicine* 41: 291-299.

Knight A (2007) Systematic reviews of animal experiments demonstrate poor human clinical and toxicological utility. *Altern Lab Anim* 35: 641-59.

Korsgaard S, Gerlach J, Christensson E (1985) Behavioral aspects of serotonin-dopamine interaction in the monkey. *Eur J Pharmacol* 118 :245-52.

Krug EG, Mercy JA, Dahlberg LL, Zwi AB (2002) The world report on violence and health. *Lancet* 360: 1083-1088.



Kudryavtseva NN, Smagin DA, Kovalenko IL, Vishnivetskaya GB (2014) Repeated positive fighting experience in male inbred mice. *Nat Protoc* 9: 2705-17.

Kuhn CM, Schanberg SM (1998) Responses to maternal separation: mechanisms and mediators. *Int J Dev Neuroscience* 16: 261-270.

Kumari V, Soni W, Sharma T (2002) Prepulse inhibition of the startle response in risperidone-treated patients: comparison with typical antipsychotics. *Schizophr Res* 55: 139-46.

Leboyer M, Bellivier F, Nosten-Bertrand M, Jouvent R, Pauls D, Mallet J (1998) Psychiatric genetics: search for phenotypes. *Trends Neurosci* 21: 102-5.

Lecrubier Y (2008) Refinement of diagnosis and disease classification in psychiatry. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 1: 6-11.

Lima VT, Macedo DS, Nogueira CR, Vasconcelos SM, Viana GS, Sousa FC (2002) Buspirone increases D2-like dopaminergic receptor density in rat corpus striatum. *Arq Neuropsiquiatr* 60: 38-40.

Logan-Greene P, Semanchin Jones A (2015) Chronic neglect and aggression/delinquency: a longitudinal examination. *Child Abuse & Neglect* 45: 9-20.

Markou A, Chiamulera C, Geyer MA, Tricklebank M, Steckler T (2009) Removing obstacles in neuroscience drug discovery: the future path for animal models. *Neuropsychopharmacology* 34: 74-89.

Mathysse S (1977) Role of dopamine in selective attention. *Adv Biochem Psychopharmacology* 16: 667-669.

Mosher LJ, Frau R, Pardu A, Pes R, Devoto P, Bortolato M (2015) Selective activation of D<sub>1</sub> dopamine receptors impairs sensorimotor gating in Long-Evans rats. *Br J Pharmacol*.

Nishi M, Hayashi-Horii N, Sasagawa T (2014) Effects of early life adverse experiences on the brain: implications from maternal separation models in rodents. *Frontiers in Neuroscience* 8: 166.

Nunes JV, Broderick PA (2007) Novel research translates to clinical cases of schizophrenic and cocaine. *Neuropsychiatr Dis Treat psychosis* 3: 475-85.

Padich RA, McCloskey TC, Kehne JH (1996) 5-HT modulation of auditory and visual sensorimotor gating: II. Effects of the 5-HT<sub>2A</sub> antagonist MDL 100, 907 on disruption of sound and light prepulse inhibition produced by 5-HT agonists in Wistar rats. *Psychopharmacology* 124: 107-16.

Perkovic MN, Strac DS, Erjavec GN, Uzun S, Podobnik J, Kozumplik O, Vlatkovic S, Pivac N (2016) Monoamine oxidase and agitation in psychiatric patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 16: 30016-1.

Phillips ML, Drevets WC, Rauch SL, Lane R (2003) Neurobiology of emotion perception II: Implications for major psychiatric disorders. *Biol Psychiatry* 54: 515-28.

Phillips ML, Frank E (2006) Redefining bipolar disorder: toward DSM-V. *Am J Psychiatry* 163: 1135-6.

Powell SB, Geyer MA (2002) Developmental markers of psychiatric disorders as identified by sensorimotor gating. *Neurotox Res* 4: 489-502.

Reynolds GP (1983) Increased concentrations and lateral asymmetry of amygdala dopamine in schizophrenia. *Nature* 30: 527-9.

Scatton B, Worms P, Lloyd KG (1982) Cortical modulation of striatal function. *Brain Res* 232: 331-343.

Scott AL, Bortolato M, Chen K, Shih JC. (2008) Novel monoamine oxidase A knock out mice with human-like spontaneous mutation. *Neuroreport* 19:73 9-43.

Seeman P, Lee T, Chau-Wong (1976). Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptor. *Nature* 261: 717-719.

Sipes TE, Geyer MA (1995) DOI disruption of prepulse inhibition of startle in the rat is mediated by 5-HT<sub>2A</sub> and not by 5-HT<sub>2C</sub> receptors. *Behav Pharmacol* 6: 839-842.

Steinpreis RE (1996) The behavioral and neurochemical effects of phenylclidine in humans and animals: some implications for modeling psychosis. *Behav Brain Res* 74: 45-55.

Swerdlow NR, Braff DL, Geyer MA (2000) Animal models of deficient sensorimotor gating: what we know, what we think we know, and what we hope to know soon. *Behav Pharmacol* 11: 185-204.

Swerdlow NR, Hanlon FM, Henning L, Kim YK, Gaudet I, Halim ND (2001) Regulation of sensorimotor gating in rats by hippocampal NMDA: anatomical localization. *Brain Res* 898: 195-203.

Szeszko PR (2015) Aggression in schizophrenia and its relationship to neural circuitry urgency. *Am J Psychiatry* 171: 897-900.

Victoroff J, Coburn K, Reeve A, Sampson S, Shillcutt S (2014) Pharmacological management of persistent hostility and aggression in persons with schizophrenia spectrum disorders: a systematic review. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 26:4.

Viswanath B, Janardhan Reddy YC, Kumar KJ, Kandavel T, Chandrashekar CR (2009) Cognitive endophenotypes in OCD: a study of unaffected siblings of probands with familial OCD. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33: 610-5.

Willner P (1986) Validation criteria for animal models of human mental disorders: learned helplessness as a paradigm case. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 10: 677-90.

Witt K, van Dorn R, Fazel S (2013) Risk factors for violence in psychosis: systematic review and meta-regression analysis of 110 studies. *PLoS ONE* 8.

Yorgason JT, Calipari ES, Ferris MJ, Karkhanis AN, Fordahl SC, Weiner JL, Jones SR (2016) Social isolation rearing increases dopamine uptake and psychostimulant potency in the striatum. *Neuropharmacology* 101: 471-479.

## RESEARCH PAPER

# Selective activation of D<sub>1</sub> dopamine receptors impairs sensorimotor gating in Long–Evans rats

Laura J Mosher<sup>1,2,3\*</sup>, Roberto Frau<sup>4\*</sup>, Alessandra Pardu<sup>4</sup>, Romina Pes<sup>1</sup>, Paola Devoto<sup>4</sup> and Marco Bortolato<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy, University of Kansas, Lawrence, KS, USA, <sup>2</sup>Consortium for Translational Research on Aggression and Drug Abuse (ConTRADA), University of Kansas, Lawrence, KS, USA, <sup>3</sup>Problem Gambling Research Studies (ProGResS) Network, University of Kansas, Lawrence, KS, USA, and <sup>4</sup>'Guy Everett' Laboratory, Dept. of Neuroscience 'B.B. Brodie', University of Cagliari, Monserrato, CA, Italy

### Correspondence

Marco Bortolato, Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy, University of Kansas, MH 5040, 1251 Wescoe Hall Dr., Lawrence, KS 66045, USA. E-mail: bortolato@ku.edu

\*L. J. M. and R. F. contributed equally to this study.

### Received

13 January 2015

### Revised

4 June 2015

### Accepted

14 June 2015

## BACKGROUND AND PURPOSE

Sensorimotor gating is a perceptual process aimed at filtering out irrelevant information. In humans and animal models, this function can be operationally measured through the prepulse inhibition (PPI) of the acoustic startle reflex. Notably, PPI deficits are associated with numerous neuropsychiatric conditions characterized by gating disturbances, including schizophrenia and Tourette syndrome. Ample evidence has shown that dopamine plays a key role in PPI regulation and, in particular, rodent studies indicate that this neurotransmitter modulates PPI through D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopamine receptors. In mice, the relative contributions of these two families of receptors are strain-dependent. Conversely, the role of D<sub>1</sub> receptors in the regulation of PPI across different rat strains remains unclear.

## EXPERIMENTAL APPROACH

We tested the effects of selective D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptor agonists and antagonists on the startle reflex and PPI of Sprague-Dawley, Wistar and Long–Evans rats.

## KEY RESULTS

In contrast with Sprague-Dawley and Wistar rats, the full D<sub>1</sub> receptor agonist SKF82958 elicited significant PPI deficits in Long–Evans rats, an effect sensitive to the selective D<sub>1</sub> antagonist SCH23390.

## CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

Our results suggest that, in Long–Evans rats, D<sub>1</sub> receptor activation may be sufficient to significantly impair PPI. These data emphasize the role of D<sub>1</sub> receptors in the pathophysiology of neuropsychiatric disorders featuring alterations in sensorimotor gating, and uphold the importance of the genetic background in shaping the role of dopamine receptors in the regulation of this key information-processing function.

## Abbreviations

LE, Long–Evans; PPI, prepulse inhibition of the acoustic startle reflex; SD, Sprague-Dawley; WIS, Wistar

## Tables of Links

TARGETS
<b>GPCRs</b>
Dopamine D <sub>1</sub> receptors
Dopamine D <sub>2</sub> receptors

LIGANDS	
Apomorphine	Quinpirole
Ecopipam	SCH23390
L741,626	SKF 38393

These Tables list key protein targets and ligands in this article which are hyperlinked to corresponding entries in <http://www.guidetopharmacology.org>, the common portal for data from the IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY (Pawson *et al.*, 2014) and are permanently archived in the Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14 (Alexander *et al.*, 2013).

## Introduction

The enactment of adaptive behavioural responses to salient environmental cues is contingent on the ability to filter out irrelevant or redundant sensory information (Geyer and Braff, 1987). Deficits in this function, termed *sensorimotor gating*, have been documented in numerous neuropsychiatric disorders characterized by information-processing deficits, including schizophrenia and Tourette syndrome (Braff *et al.*, 2001).

One of the best-validated operational indices to measure gating integrity is the prepulse inhibition (PPI) of the acoustic startle reflex. This endophenotype consists of the reduction of startle response triggered by a dim pre-stimulus immediately preceding the response-eliciting burst (Hoffman and Ison, 1980). Over the past two decades, PPI has attracted substantial interest in neuroscience and psychiatric research, in view of its well-consolidated relevance to psychopathology as well as a number of operational advantages, including its validity as a cross-species testing paradigm for humans and experimental animals, which makes it particularly appealing in the context of translational studies (Swerdlow *et al.*, 1999; 2008).

In line with the pivotal function of dopamine in information-processing functions, several studies have shown that this neurotransmitter plays a major role in the orchestration of PPI in humans (Bitsios *et al.*, 2005), as well as rodents (Dulawa and Geyer, 1996; Zhang *et al.*, 2000; Geyer *et al.*, 2001; Swerdlow *et al.*, 2001) and other vertebrates (Burgess and Granato, 2007). In rats and mice, agonists of dopamine receptors have been shown to produce robust PPI deficits (Mansbach *et al.*, 1988; Dulawa and Geyer, 1996; Geyer *et al.*, 2001). These impairments have been likened to the sensorimotor gating deficits observed in neuropsychiatric patients, by virtue of their sensitivity to antipsychotic agents (Mansbach *et al.*, 1988; Geyer *et al.*, 1990; 2001; Swerdlow *et al.*, 1991).

Numerous studies have shown that the role of dopamine in PPI is mediated by both D<sub>1</sub>- and D<sub>2</sub>-like receptors; nevertheless, the specific contributions of these receptors to sensorimotor gating vary across different rodent models. While PPI deficits are elicited by D<sub>2</sub> dopamine receptor agonists in Sprague-Dawley (SD) and Wistar (WIS) albino outbred rats (Peng *et al.*, 1990; Varty and Higgins, 1998), these drugs fail to disrupt PPI in most mouse strains commonly used in behavioural research (Ralph-Williams *et al.*, 2003; Ralph and Caine,

2005). Conversely, D<sub>1</sub>-like receptor agonists produce robust PPI deficits in most mouse strains, but are inherently unable to reduce PPI in SD rats. However, these drugs potentiate the effects of D<sub>2</sub> receptor agonists and other key PPI disruptors, such as NMDA glutamate receptor antagonists (Wan *et al.*, 1996; Bortolato *et al.*, 2005). It should be noted that high doses of the full D<sub>1</sub> receptor agonist SKF82958 were shown to induce PPI deficits in SD rats but these changes were found to be mediated by D<sub>2</sub>, rather than D<sub>1</sub> receptors (Wan *et al.*, 1996).

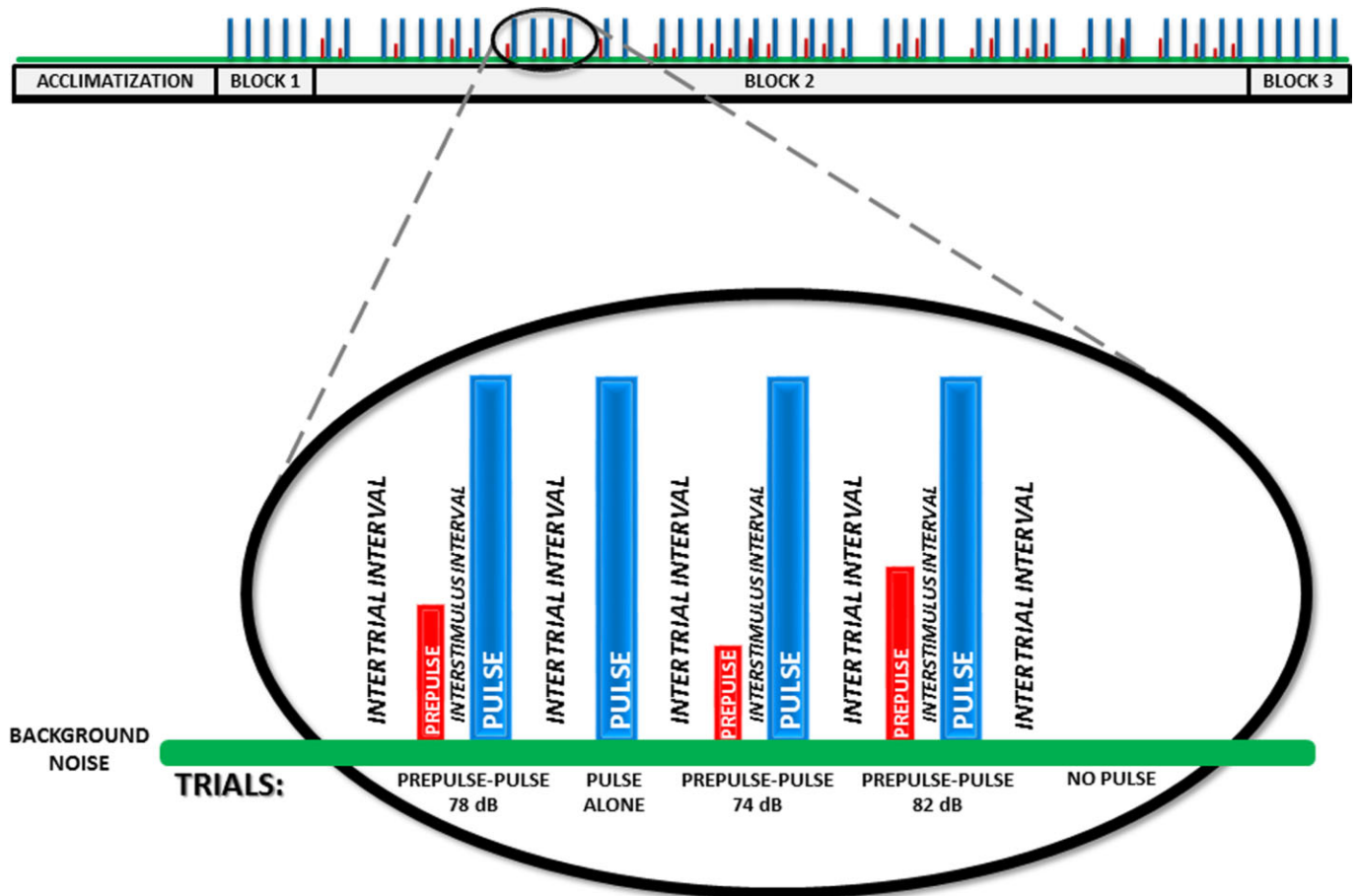
The dichotomy between mice and rats with respect to their different sensitivity to dopamine receptor agonists was originally posited to reflect interspecies differences. More recently this interpretation has been challenged by Ralph and Caine (2007), who identified PPI deficits also in response to D<sub>2</sub> receptor agonists in less commonly used mouse strains. Although few studies have documented the occurrence of PPI deficits in rats following administration of D<sub>1</sub> receptor agonists (Ralph and Caine, 2005), the lack of concomitant experiments on D<sub>1</sub> receptor antagonists in those studies leaves the question open as to whether some rat strains may exhibit independent D<sub>1</sub>-mediated PPI deficits in a fashion similar to that observed in most mouse strains.

To address this issue, we have studied the effects of different D<sub>1</sub> receptor agonists and antagonists in SD, WIS and Long-Evans (LE) hooded rats. Our data indicate that, under specific protocol settings, LE rats (but not albino strains) showed a specific reduction of PPI in response to a moderate, D<sub>1</sub>-selective dose of SKF82958 and that this effect was sensitive to D<sub>1</sub> receptor antagonism.

## Methods

### Animals

All animal care and experimental procedures were in compliance with the National Institute of Health guidelines and approved by the Institutional Animal Use Committees of the University of Kansas and Cagliari. All studies involving animals are reported in accordance with the ARRIVE guidelines for reporting experiments involving animals (Kilkenny *et al.*, 2010; McGrath *et al.*, 2010). The present study was conducted on 207 male SD, 106 WIS (Harlan, Italy) and 174 LE rats (Charles River Laboratories, Raleigh, NC, USA). Rats (3–4 months old; 300–350 g of body weight) were housed



**Figure 1**

Scheme of the PPI paradigm. The green horizontal bar represents the 70 dB background noise; the blue vertical bars represent the 120 dB pulse trials; the red vertical bars represent the three prepulse levels of 74 dB, 78 dB and 82 dB. The complete session is outlined at the top with a portion enlarged to detail a subset of the trials. The acclimatization represents 5 min of exposure to the background noise; block 1 represents five pulse-alone trials; block 2 represents 50 trials containing a pseudorandom sequence of no stimulus trials, pulse alone trials and prepulse-pulse trials; block 3 represents five pulse-alone trials.

3–4 per cage in rooms maintained at a temperature of  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  and a humidity of 60%. Animals were given *ad libitum* access to food and water and held under an artificial 12/12 h light/dark cycle, with lights off from 10:00 a.m. to 10:00 p.m. In order to reduce stress during the experiment, each rat was handled gently for 5 min each day of the week preceding the behavioural testing. Care was taken in ascertaining the uniformity of all husbandry conditions across the two facilities where the experiments were performed (University of Kansas and University of Cagliari, Italy).

### *Apparatus and experimental procedure*

Startle and PPI were tested as previously described (Frau *et al.*, 2007). The apparatus used for detection of startle reflexes (Med Associates, St Albans, VT, USA) consisted of six standard cages placed in sound-attenuated chambers with fan ventilation. Each cage consisted of a Plexiglas cylinder of 9 cm diameter, mounted on a piezoelectric accelerometric platform connected to an analogue-digital converter. Two separate speakers conveyed background noise and acoustic bursts, each one

properly placed so as to produce a variation of sound within 1 dB across the startle cage. Both speakers and startle cages were connected to a main PC, which detected and analysed all chamber variables with specific software. Before each testing session, acoustic stimuli and mechanical responses were calibrated via specific devices supplied by Med Associates.

Rats were first subjected to a pre-test session, during which they were exposed to a sequence of seventeen trials, consisting of 40 ms, 115 dB burst, with a 70 dB background white noise. Experimental groups were defined based on the average startle amplitude of the rats, so as to maintain comparable values of average startle response across all groups.

Three days after the pre-test session, rats were treated and were exposed to a test session (Figure 1). This session featured a 5 min acclimatization period, with a 70 dB background white noise, which continued for the remainder of the session. The acclimatization period was followed by three blocks, each consisting of a sequence of trials: the first and the third block consisted of five pulse-alone trials of 115 dB (identical to those used in the pre-test session). The second

block consisted of a pseudorandom sequence of 50 trials, including 12 pulse-alone trials, 30 trials of pulse preceded by 74, 78 or 82 dB pre-pulses (10 for each level of pre-pulse loudness), and eight no-pulse trials, where only the background noise was delivered. Inter-trial intervals (i.e. the time between two consecutive trials) were selected randomly between 10 and 15 s.

The % PPI was calculated only on the values relative to the second period, as well, using the following formula:

$$100 - \left( \frac{\text{mean startle amplitude for prepulse pulse trials}}{\text{mean startle amplitude for pulse alone trials}} \right) \times 100$$

For both the pre-test and the test session, the interstimulus interval (i.e. the duration between the prepulse and the pulse in each trial) was kept at 100 ms. The selection of this interstimulus interval was based on pilot data and previously published experiments from our group (Bortolato *et al.*, 2005), which showed this parameter to be optimally suited to reveal PPI deficits in response to indirect and direct DA receptor agonists in rats under our experimental settings.

### Experimental procedure

This study encompassed six experiments, each involving 8–13 rats per group. The first experiment was aimed at assessing what doses of the full D<sub>1</sub> receptor agonist SKF82958 (1–5 mg·kg<sup>-1</sup>, s.c., in comparison with saline, 10 min before behavioural testing) may produce alterations in PPI in SD, WIS and LE rats under our experimental conditions.

Although SKF82958 is one of the most potent D<sub>1</sub> receptor agonists, its D<sub>1</sub>:D<sub>2</sub> selectivity ratio (10:1) has been shown to be relatively modest in comparison with other benzazepine D<sub>1</sub> receptor agonists (Murray and Waddington, 1990). Indeed, previous reports showed that, in SD rats, its PPI-disrupting effects were primarily mediated by D<sub>2</sub>, rather than D<sub>1</sub> receptors (Wan *et al.*, 1996). To assess whether the effects of this agent on other rat strains may be ascribed to similar phenomena, in the second experiment, we tested whether the PPI-disrupting effects of SKF82958 across different strains may be prevented by the selective D<sub>1</sub> receptor antagonist SCH23390 (0.1 mg·kg<sup>-1</sup>, s.c.). Rats from each strain were therefore pretreated with either saline or the potent D<sub>1</sub> receptor antagonist, SCH23390; 10 min later, rats were injected with either saline or a dose of SKF82958 that induced PPI deficits (based on the results of the first experiment). Testing occurred 10 min after SKF82958 injection. The third experiment mirrored the design of the second, and assessed the highly selective D<sub>2</sub> receptor antagonist L741626 (1 mg·kg<sup>-1</sup>, s.c.) in SD and LE rats. Rats were pretreated with either the D<sub>2</sub> receptor antagonist L741626 or VEHL; 20 min later, animals were injected with either saline or SKF82958. Testing occurred 10 min after SKF82958 administration.

The fourth experiment was conducted to determine the effects of the partial D<sub>1</sub> receptor agonist SKF38393 (5–10 mg·kg<sup>-1</sup>, s.c.) on PPI in SD, WIS and LE rats. Animals were treated with SKF38393 or saline, 10 min prior to being placed in the startle apparatuses for testing.

In the fifth experiment, we evaluated the effects of the prototypical D<sub>2</sub> receptor agonist quinpirole (0.6 mg·kg<sup>-1</sup>, s.c., 5 min prior to testing) in SD and LE rats. Furthermore, to

assess the specificity of this effect, we assessed whether the PPI deficits induced by quinpirole may be prevented by L741626 (1 mg·kg<sup>-1</sup>, s.c., 25 min prior to quinpirole injection).

In the sixth and final experiment, we tested the effects of the D<sub>1</sub>/D<sub>2</sub> receptor agonist apomorphine (0.25–0.5 mg·kg<sup>-1</sup>, s.c.) on sensorimotor gating in SD, WIS and LE rats. Apomorphine was injected immediately before placing the animals in the startle apparatuses for testing.

### Materials

The following drugs were used: SKF 82958 hydrobromide, SKF 38393, SCH23390, L741626, apomorphine hydrochloride and quinpirole (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). SKF 82958, SKF 38393, SCH 23390 and quinpirole were dissolved in 0.9% saline solution. L741626 was dissolved in a vehicle (VEHL) of 1 mg·mL<sup>-1</sup> lactic acid and 0.9% saline. Apomorphine was dissolved in a vehicle (VEHA) of 0.9% saline and 1 mg·mL<sup>-1</sup> ascorbic acid to prevent oxidation. All drugs were administered via either s.c. or i.p injection, in 1 mL·kg<sup>-1</sup> injection volume.

### Data analysis

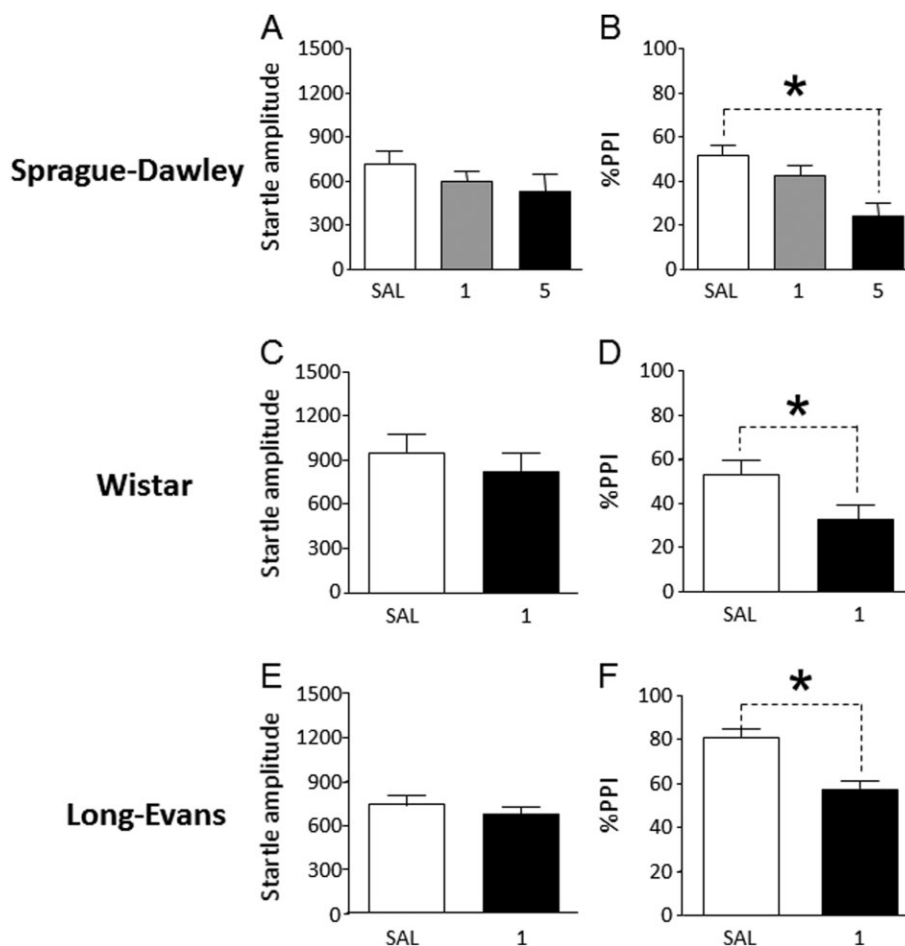
Normality and homoscedasticity of data were verified by Kolmogorov–Smirnov and Bartlett's tests. Data were compared across groups by one-way or two-way ANOVAs, as appropriate. As no interaction between prepulse levels and treatment were found in the statistical analysis, %PPI values were collapsed across prepulse intensity to represent average %PPI. *Post hoc* analyses were performed using Tukey's test with Spjøtvoll Stoline correction. Significance threshold was set at 0.05.

## Results

### Assessment of effects of D<sub>1</sub> receptor agonists in SD, WIS and LE rats

In the first series of experiments (Figure 2), we tested the effects of the full D<sub>1</sub> receptor agonist SKF82958 (1–5 mg·kg<sup>-1</sup>, SC) on the startle responses and PPI of SD, WIS and LE rats. In SD rats (Figure 2A–B; *n* = 9 per group), this drug did not significantly modify startle amplitude; however, in conformity with previously published data (Wan *et al.*, 1996), its highest dose (5 mg·kg<sup>-1</sup>, s.c.) produced a marked reduction of PPI in comparison with saline [*F*(2,24) = 8.71, *P* < 0.05]. Conversely, the dose of 1 mg·kg<sup>-1</sup> of SKF82958 was sufficient to reduce PPI in both WIS (Figure 2C–D) and LE rats (Figure 2E–F; *n* = 9 per group for each strain) {WIS: [*F*(1,16) = 4.69]; LE: [*F*(1,16) = 29.38], *P*s < 0.05}, without altering startle amplitude.

In SD rats (*n* = 10 per group), SCH23390 produced a significant reduction in startle amplitude [main effect: *F*(1,36) = 5.28, *P* < 0.05]; conversely, this parameter was not affected by either SKF82958 (5 mg·kg<sup>-1</sup>, s.c.) treatment or its interaction with SCH23390 (Figure 3A). In the same strain, SKF82958 significantly reduced PPI [main effect: *F*(1,36) = 35.30, *P* < 0.05]; however, in confirmation of previous data (Wan *et al.*, 1996), this effect was not countered by the D<sub>1</sub> receptor (Figure 3B), confirming that, in SD rats, the PPI-



## Figure 2

Effects of the D<sub>1</sub> receptor full agonist SKF82958 or its vehicle, saline (SAL), on startle reflex and PPI of the startle in SD, WIS and LE rats. Values represent mean  $\pm$  SEM for each experimental group. Doses of SKF82958 (1 or 5 mg·kg<sup>-1</sup>, s.c.) are indicated below the horizontal axis. \* $P < 0.05$  in comparison with saline-treated controls. For more details, see text.

disrupting effects of SKF82958 are not mediated by D<sub>1</sub> receptors. These results were mirrored by our findings in WIS rats ( $n = 9$  per group). Indeed, in this strain, SCH23390 produced a significant reduction of startle amplitude [main effect:  $F(1,32) = 19.09$ ,  $P < 0.05$ ] (Figure 3C); furthermore, while SKF82958 (1 mg·kg<sup>-1</sup>, s.c.) reduced PPI levels in this strain [ $F(1,32) = 15.82$ ,  $P < 0.05$ ], this effect was not prevented by SCH23390 (Figure 3D).

In contrast with albino strains, in LE rats ( $n = 8$ – $10$  rats per group), SCH23390 pretreatment produced a significant enhancement in startle amplitude [main effect:  $F(1,34) = 10.75$ ,  $P < 0.05$ ]; conversely, ANOVA failed to detect a significant main effects for SKF82958 or interactions between the two treatments (Figure 3E). The analysis of PPI confirmed that SKF82958 significantly reduced this index [ $F(1,34) = 26.84$ ,  $P < 0.05$ ]; however, in contrast with the other rat strains, this effect was prevented by SCH23390 [pretreatment  $\times$  treatment interaction:  $F(1,34) = 6.76$ ,  $P < 0.05$ ], suggesting that the PPI-disrupting effects of SKF82958 were mediated by D<sub>1</sub> receptors in this strain (Figure 3F).

We then examined whether the PPI deficits induced by SKF82958 may be countered by the selective D<sub>2</sub> receptor

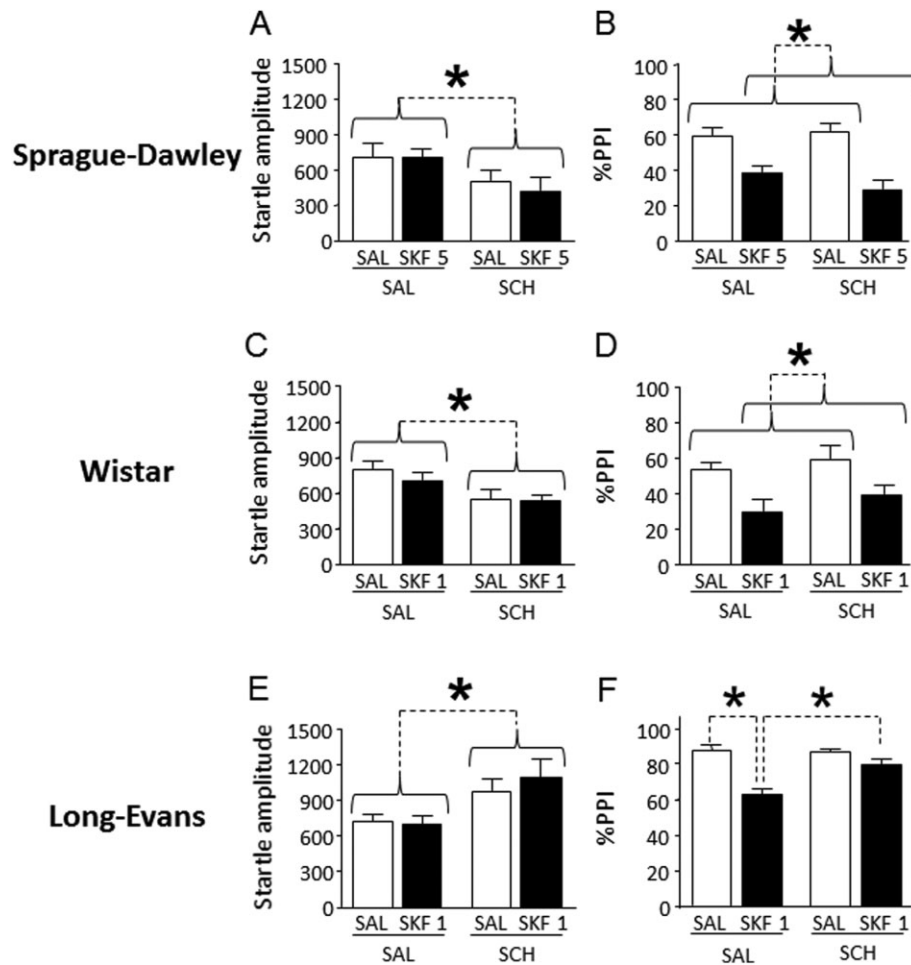
antagonist L741626. The combination of L741,626 (1 mg·kg<sup>-1</sup>, s.c.) and SKF82958 (5 mg·kg<sup>-1</sup>, s.c.) failed to induce significant alterations in startle magnitude in both SD ( $n = 10$  per group; Figure 4A) and LE rats ( $n = 8$  per group; Figure 4C). Conversely, the PPI deficits induced by SKF82958 were significantly prevented by L741,626 in SD [ $F(1,36) = 17.29$ ,  $P < 0.05$ ] (Figure 4B), but not LE rats (Figure 4D).

Finally, we studied the effects of the partial D<sub>1</sub> receptor agonist SKF38393 (5–10 mg·kg<sup>-1</sup>, s.c.) on the startle reflex and PPI of SD, WIS and LE rats. Notably, this drug failed to affect either parameter in any strain (Figure 5).

## Assessment of effects of D<sub>2</sub> receptor activation in SD and LE rats

In SD rats, quinpirole treatment decreased the mean startle amplitude [ $F(1,36) = 48.51$ ,  $P < 0.05$ ], but this effect was not modified by the D<sub>2</sub> antagonist L741626 (Figure 6A). Both L741626 [main effect;  $F(1,36) = 10.12$ ,  $P < 0.05$ ] and quinpirole [main effect;  $F(1,36) = 14.88$ ,  $P < 0.05$ ] significantly modified PPI, but no significant interaction of their effects was found (Figure 6B). In LE rats, startle analyses showed a





**Figure 3**

Involvement of  $D_1$  receptors in the effects of SKF82958 (SKF; 5 mg·kg<sup>-1</sup>, s.c.) in SD rats and 1 mg·kg<sup>-1</sup>, s.c.) in WIS and LE rats on the regulation of startle reflex and PPI in different rat strains, as tested through the combined treatment with the selective  $D_1$  receptor antagonist SCH23390 (SCH; 0.1 mg·kg<sup>-1</sup>, IP). Values represent mean ± SEM for each experimental group. Doses of SKF are indicated in mg·kg<sup>-1</sup>. \* $P < 0.05$ , significantly different as indicated. For more details, see text.

significant interaction between quinpirole and L741626 [ $F(1,28) = 6.8$ ,  $P < 0.05$ ]; *post hoc* analyses revealed that L741626 increased startle response, while quinpirole significantly decreased it both in VEHL- and L741626-pretreated animals (Figure 6C). The analysis of PPI in LE rats detected a significant interaction between quinpirole and L741626 [ $F(1,28) = 8.07$ ,  $P < 0.05$ ]. *Post hoc* analyses revealed that quinpirole led to a significant PPI deficit, which was fully countered by L741626 (Figure 6D).

#### Assessment of effects of apomorphine in SD, WIS and LE rats

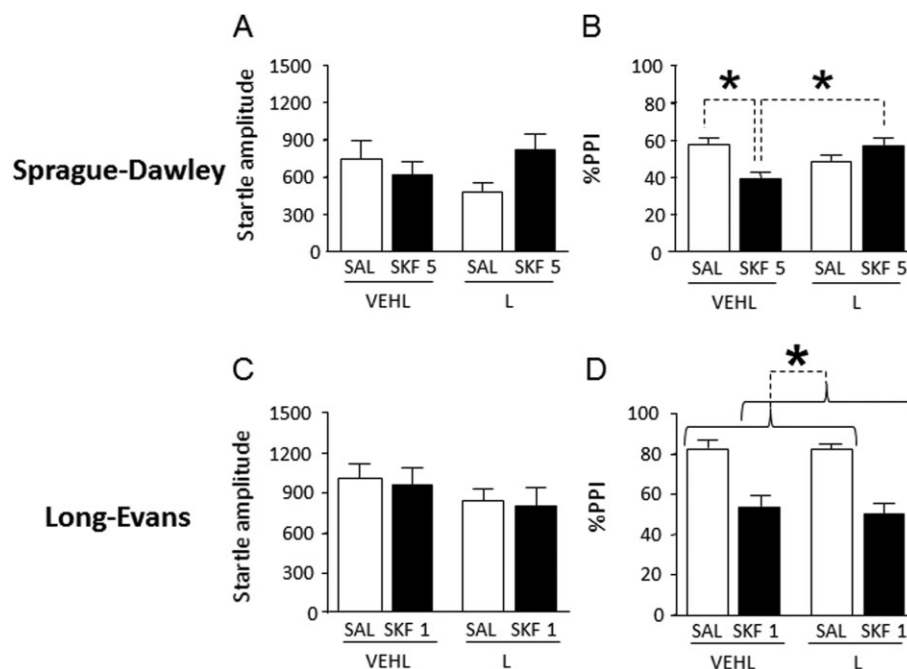
In SD rats ( $n = 10$  per group), apomorphine failed to affect startle magnitude (Figure 7A), but reduced PPI [ $F(2,27) = 5.09$ ,  $P < 0.05$ ]. *Post hoc* analyses showed that the reduction in PPI was produced by the dose of 0.25 mg·kg<sup>-1</sup> (Figure 7B). In WIS rats ( $n = 10$  per group), apomorphine did not reduce startle amplitude (Figure 7C); the higher dose of apomorphine significantly decreased PPI [ $F(2,27) = 4.25$ ,  $P < 0.05$ ]. In LE rats

( $n = 10$ –12 per group), apomorphine did not significantly affect startle amplitude, but produced a robust PPI disruption [ $F(2,32) = 13.27$ ,  $P < 0.05$ ]. Significant differences were found for both the doses of 0.25 and 0.5 in comparison with VEHA.

## Discussion

The main result of this study show that, in contrast with SD and WIS albino rats, hooded LE animals display a significant impairment in sensorimotor gating in response to selective, full stimulation of  $D_1$  dopamine receptors. Specifically, under our experimental settings, the full  $D_1$  agonist SKF82958, but not the partial  $D_1$  agonist SKF38393 produced a significant PPI reduction, which was not paralleled by variations in startle amplitude, and was countered by  $D_1$ , but not  $D_2$  receptor antagonist.

To the best of our knowledge, this is one of the first reports demonstrating PPI deficits following the selective and



**Figure 4**

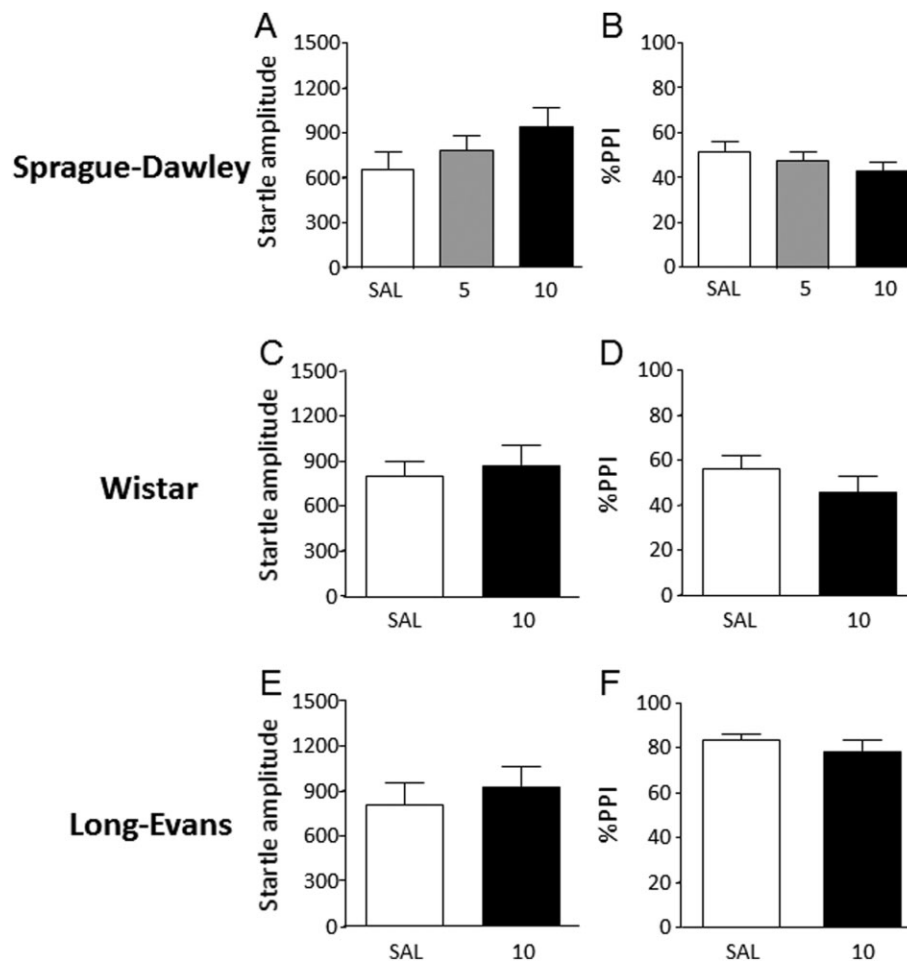
Involvement of D<sub>2</sub> receptors in the effects of SKF82958 (SKF) on the regulation of startle reflex and PPI in different rat strains, as tested through the combined treatment with the selective D<sub>2</sub> receptor antagonist L741,626 (L; 1 mg·kg<sup>-1</sup>, s.c.). Values represent mean ± SEM for each experimental group. PPI values are represented as the means of all prepulse-loudness values. Doses of SKF are indicated in mg·kg<sup>-1</sup>. VEHL, vehicle for L741,626; \*P < 0.05, significantly different as indicated. For more details, see text.

independent activation of D<sub>1</sub> receptors in rats. Numerous rat studies have shown the implication of both D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors in the PPI-disrupting properties of non-selective dopaminergic agonists in SD, WIS and LE rats (Mansbach *et al.*, 1988; Wan *et al.*, 1996; Rasmussen *et al.*, 1997; Feifel, 1999). The general consensus, however, has pointed to an ancillary role of D<sub>1</sub> dopamine receptors in the regulation of sensorimotor gating in rats. This assumption has been largely based on numerous experimental results on albino rat strains, which showed that D<sub>1</sub> receptor agonists, albeit able to potentiate the PPI-disrupting properties of D<sub>2</sub> receptor agonists or NMDA glutamate receptor blockers, failed to intrinsically reduce PPI in a selective fashion (Wan *et al.*, 1996; Bortolato *et al.*, 2005). For example, while SD rats display PPI deficits in response to SKF82958 or related agents (such as R-6-Br-APB [R(+)-6-bromo-7,8-dihydroxy-3-allyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine]; Wan *et al.*, 1996; Swerdlow *et al.*, 2001; Ralph and Caine, 2005), these impairments were found to reflect the activation of D<sub>2</sub>, rather than D<sub>1</sub> receptors (Wan *et al.*, 1996). Accordingly, the present results showed that, in albino rats, the PPI disruption caused by SKF82958 was prevented by administration of L741626, but not SCH23390. In this perspective, our findings highlight an unequivocal link between D<sub>1</sub> receptor activation and sensorimotor gating deficits, and provide an experimental model to elucidate the role of these receptors in the regulation of rat PPI.

The mechanisms underpinning the role of D<sub>1</sub> or D<sub>2</sub> receptors in PPI regulation are incompletely understood. While several studies have identified that the PPI-disrupting prop-

erties of non-selective dopaminergic agonists are primarily contributed by the nucleus accumbens (Swerdlow *et al.*, 1990), the specific localization of each receptor subtype is not well understood. In particular, recent data have shown that D<sub>1</sub> receptors in the prefrontal cortex may play an opposing role (Shoemaker *et al.*, 2005). Thus, it is possible that the specific effects of D<sub>1</sub> receptor agonists may result from the sum of opposing contributions of this receptor across different brain areas. Further studies will be needed to ascertain this possibility. Interestingly, previous studies have shown that the differences between LE and SD rats on the role of dopamine receptors in PPI regulation depends on mechanisms of dopamine receptor signalling in the nucleus accumbens (Saint Marie *et al.*, 2006; Swerdlow *et al.*, 2006; 2007; Shilling *et al.*, 2008). From this perspective, it is worth noting that these results provide a first experimental platform to study the mechanism supporting the independent contributions of D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptor activation to dopaminergic PPI deficits in different rat strains.

In contrast with the effects of SKF82958, SKF38393 failed to impair PPI in any strain. The inability of the latter drug to produce PPI deficits confirms previous data from our group and others (Bortolato *et al.*, 2005), and is likely to result from its partial efficacy in activating the adenylyl cyclase coupled to D<sub>1</sub> receptors, which corresponds approximately to 50–70% of that of dopamine (Arnt *et al.*, 1988; Andersen and Jansen, 1990; Gnanalingham *et al.*, 1995) and is markedly lower than that of SKF82958, a full D<sub>1</sub> receptor agonist (O'Boyle *et al.*, 1989; Andersen and Jansen, 1990). Indeed, comparative analyses of these two benzazepine derivatives have shown



**Figure 5**

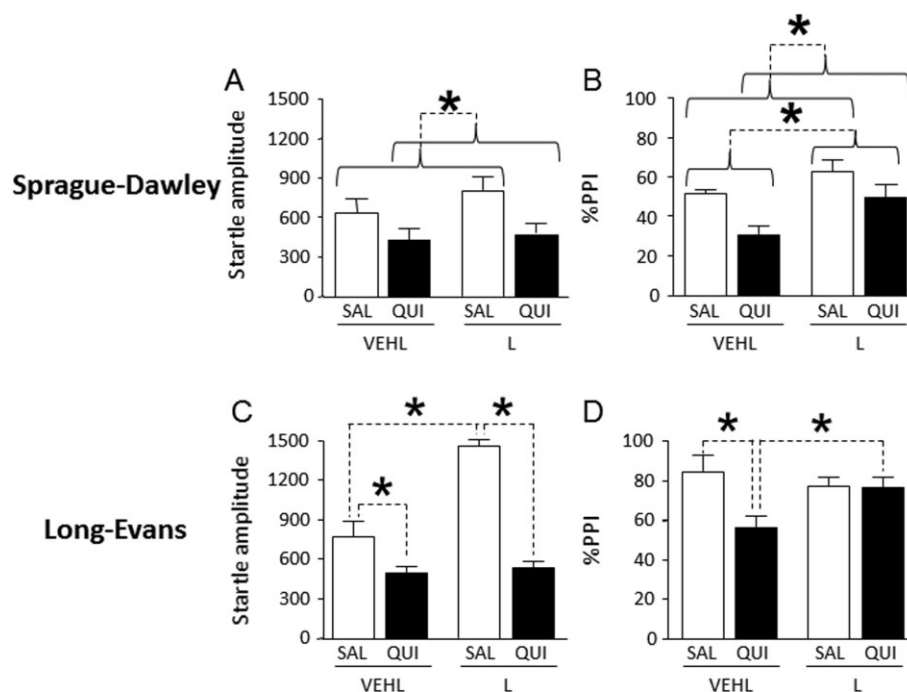
Effects of the D<sub>1</sub> receptor partial agonist SKF38393 or its vehicle, saline (SAL), on startle reflex and PPI of the startle in SD, WIS and LE rats. Values represent mean  $\pm$  SEM for each experimental group. Doses of SKF38393 (in mg·kg<sup>-1</sup>, s.c.) are indicated below the horizontal axis. For more details, see text.

that SKF82958 elicits a number of phenotypes not typically observed following administration of SKF38393, including activation of early-response genes (Gerfen *et al.*, 1990; Jiang *et al.*, 1990; Robertson *et al.*, 1991; Wirtshafter and Asin, 1994; Wang and McGinty, 1996), tyrosine phosphorylation of NMDA receptor subunits (Dunah and Standaert, 2001) and activation of vertical locomotor activity (Meyer and Shults, 1993). Thus, these data may signify that, in LE rats, PPI deficits may be triggered only by the full stimulation of D<sub>1</sub> receptors and its downstream signalling machinery.

Pharmacological and genetic studies have shown that D<sub>1</sub> receptors play a predominant role in the dopaminergic modulation of dopamine in mice (Ralph-Williams *et al.*, 2002; 2003). While these findings initially suggested a potential dichotomy between mice and rats with respect to the regulation of sensorimotor gating, this conclusion was later challenged by further studies, which showed that D<sub>2</sub> receptor activation could disrupt PPI in other mouse strains used less commonly in research (Ralph and Caine, 2007). The present results further expand on these observations, and indicate that, at least within specific setting conditions, PPI may be

independently regulated by both D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors in mice and rats, and that inter-strain variations may play a critical role in the relative importance of each target in sensorimotor gating. In line with this conclusion, previous studies have shown that the dopaminergic regulation of startle reactivity and PPI is strongly influenced by differences in strains and genetic background in rats (Swerdlow *et al.*, 2004; 2006).

We have shown here that, while SKF82958 failed to affect startle response across all rat strains, SCH23390 had apparently opposing intrinsic roles in affecting startle amplitude. Indeed, while this parameter was mildly, yet significantly reduced by D<sub>1</sub> receptor blockade in SD and WIS rats, it was modestly increased in LE animals. While this discrepancy cannot account for the observed differences in PPI responses across these strains, our data may suggest that the role of D<sub>1</sub> receptors in LE rats may also diverge with respect to the regulation of startle reactivity. Our data are apparently in partial contrast with previous reports, which documented that D<sub>1</sub> receptor activation enhances startle response in SD rats (Meloni and Davis, 1999). A likely explanation for this apparent divergence lies in the characteristics of our testing



### Figure 6

Involvement of  $D_2$  receptors in the effects of quinpirole (QUI) on the regulation of startle reflex and PPI in different rat strains, as tested through the combined treatment with the selective  $D_2$  receptor antagonist L741,626 (L; 1 mg·kg<sup>-1</sup>, s.c.). Values represent mean ± SEM for each experimental group. PPI values are represented as the means of all prepulse-loudness values. VEHL, vehicle for L741,626; \* $P$  < 0.05, significantly different as indicated. For more details, see text.

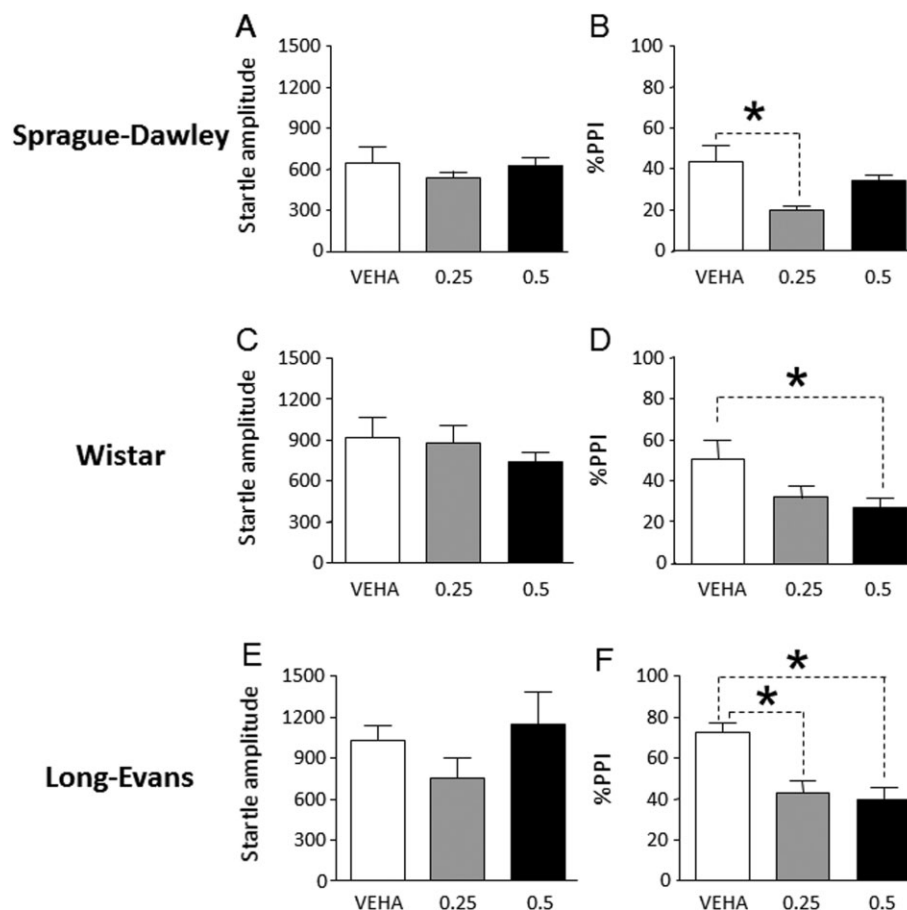
protocol, which was optimized for the assessment of dopaminergic effects on PPI, rather than startle reactivity. Irrespective of these considerations, future comparative studies are warranted to evaluate the specific impact of  $D_1$  receptors in the modulation of acoustic startle amplitude across different rat strains.

Although the present studies do not provide any direct mechanism to account for the differential responsiveness of LE rats to  $D_1$  receptor activation with respect to PPI, several data indicate that the dopaminergic system in this strain is distinctly different from that of albino rats. In rats, albinism is primarily due to a genetic defect in tyrosinase (Searle, 1990), leading to low melanin production. In the presence of tyrosinase, dopamine and its precursor L-DOPA inactivate the rate-limiting enzyme for dopamine synthesis, tyrosine hydroxylase (Xu *et al.*, 1998). Accordingly, intracerebral infusion of tyrosinase leads to enhanced dopamine release (Amicarelli *et al.*, 1999). Previous studies have documented that the tyrosinase levels in LE rats were associated with higher dopamine turnover in comparison with SD rats (Swerdlow *et al.*, 2005) and, indeed, LE rats display higher corticolimbic levels of the dopamine metabolic enzyme catechol-O-methyl transferase (Shilling *et al.*, 2008). Furthermore, fur pigmentation in LE rats is negatively correlated with the effects of apomorphine on PPI (Swerdlow *et al.*, 2006), suggesting that the activity of dopamine receptors is also influenced by different levels of tyrosinase. Taken together, these data suggest that the differences in PPI regulation between albino and LE rats may be underpinned by

changes in  $D_1$  receptor responsiveness. The possibility that albino rats may present alterations in  $D_1$  response is also supported by evidence showing that the domestication process of rats has led to significant differences in dopaminergic responses (Nikulina *et al.*, 1992), likely to be due to the active selection of tameness and exclusion of aggressive traits (Himmler *et al.*, 2013).

Given that LE rats were originally obtained by crossing a WIS dam with a wild sire (Freudenberger, 1932; Altman and Katz, 1979), our data raise the possibility that wild rats or other fully pigmented strains may exhibit an even greater responsiveness to  $D_1$  receptor agonists than that of LE animals. Although logistical and safety considerations pose important problems in behavioural testing of wild rats, further studies are warranted to analyse the differential impact of albino and pigmented strains with respect to the dopaminergic regulation of sensorimotor gating.

As previously indicated, it should be emphasized that the PPI-disrupting effects of  $D_1$  receptor activation in LE rats were revealed under specific protocol settings. Different testing conditions and protocol indices can greatly influence PPI, such as the loudness of the startle-eliciting pulse and the prepulses (with respect to the background noise), the duration of the inter-stimulus and inter-trial intervals, as well as the resilience of the accelerometric platform (Geyer and Swerdlow, 1998). In this respect, it is important to notice that our results were paralleled by Swerdlow and colleagues at the University of California San Diego (N. Swerdlow, pers. comm.), who found that, when tested with inter-stimulus



### Figure 7

Effects of the non-selective dopaminergic agonist apomorphine or its vehicle (VEHA) on startle reflex and PPI of the startle in SD, WIS and LE rats. Values represent mean  $\pm$  SEM for each experimental group. Doses of apomorphine (in  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , s.c.) are indicated below the horizontal axis. \* $P < 0.05$ , in comparison to vehicle-treated controls. For more details, see text.

intervals of 120 ms, LE rats exhibited a %PPI baseline of approximately 80%, and responded to the full  $D_1$  receptor agonist SKF81927 with a significant reduction of PPI to about 60%. However, in the presence of shorter inter-stimulus intervals, the same  $D_1$  receptor agonist elicited either no significant effect or even enhancements of PPI (depending on the specific duration of the interval). It is also possible that the high baseline levels in our experiment may have facilitated the detection of  $D_1$ -mediated PPI deficits. Accordingly, previous studies have shown that baseline PPI values play a fundamental role in influencing the susceptibility to the effects of pharmacological treatments on PPI modulation. Indeed, similar conclusions were recently drawn in human studies (Bitsios *et al.*, 2005). In light of these considerations, it is possible that, while the conditions of our testing protocol may be optimal to capture the contribution of  $D_1$  receptors to PPI regulation, extreme caution should be advocated in the interpretation and generalization of these results, as they are likely to refer to a relatively narrow range of experimental conditions, whose biological significance remains to be determined.

We also confirmed that, under the same settings, LE rats exhibited PPI deficits also in response to the  $D_2$  receptor

agonist quinpirole (which were selectively reversed by the highly selective  $D_2$  receptor antagonist L741626) and the  $D_1/D_2$  non-selective agonist apomorphine. Conversely, although the same startle protocol evoked PPI impairments in SD and WIS rats in response to quinpirole and apomorphine, no significant  $D_1$ -dependent PPI deficits were identified in either strain. Indeed, while SKF82958 elicited PPI deficits in both strains, as previously published (Wan *et al.*, 1996; Swerdlow *et al.*, 2000), these impairments were prevented by the selective  $D_2$  receptor blocker L741626, rather than by the  $D_1$  receptor antagonist SCH23390. The sensitivity of all tested strains to quinpirole confirms that, in rats,  $D_2$  receptors serve a prominent role in the regulation of PPI.

As mentioned in the Introduction, PPI has gained wide acceptance as the main operational paradigm for sensorimotor gating testing, because of its cross-species validity. Deficits in this index have been documented across several neuropsychiatric disorders, including schizophrenia and Tourette syndrome (Braff *et al.*, 2001). Building from this observation, it is interesting to observe that  $D_1$  receptors have been implicated in the pathophysiology of both conditions. In schizophrenia, these targets have been widely implicated in the modulation of cognitive deficits and negative symptoms (Abi-Dargham,

2003). In particular, both overstimulation and suppression of D<sub>1</sub> receptors may result in impairments of working memory (Williams and Goldman-Rakic, 1995), a core cognitive deficit of schizophrenia. Furthermore, while stimulation of D<sub>1</sub> receptors has been largely advocated as a potential therapeutic strategy to reduce the severity of negative and cognitive symptoms, preliminary studies provided anecdotal support for an efficacy of D<sub>1</sub> receptor blockers in the reduction of negative symptoms (de Beaufrepaire *et al.*, 1995; Den Boer *et al.*, 1995; but see also Karlsson *et al.*, 1995 for contrasting data). While the role of D<sub>1</sub> receptors in the pathophysiology of Tourette syndrome is not as well established, emerging evidence has pointed to this receptor as a promising therapeutic target; indeed, the selective D<sub>1</sub> receptor antagonist ecopipam has been recently shown to be effective in reducing tic severity (Gilbert *et al.*, 2014).

The identification of a strain-specific role of D<sub>1</sub> receptors in PPI and startle regulation suggests that the specific interactions between this receptor and genetic factors may be essential in influencing PPI and, potentially, the pathophysiology of schizophrenia and Tourette syndrome. This concept is in keeping with ample evidence emphasizing the genetic roots of both disorders (Kendler and Diehl, 1993; Sullivan, 2005; O'Rourke *et al.*, 2009; Deng *et al.*, 2012).

Several limitations of our study should be acknowledged. First, our analyses did not include molecular studies to evaluate the mechanisms underpinning the observed interstrain differences with respect to the role of D<sub>1</sub> receptor in startle and PPI regulation. Secondly, unlike the studies on D<sub>1</sub> receptors, our experiments on the effects of quinpirole were only performed in animals subjected to a pretreatment; thus, we cannot rule out that some of the observed findings may be affected by the stress related to the pretreatment injection. Finally, although our experiments were performed on equivalent experimental protocols and apparatuses, it is worth noting that the experiments were performed in two different laboratories (SD and WIS at the University of Cagliari, and LE at the University of Kansas). Thus, we cannot completely exclude that these logistic differences, or divergences in the colonies from the suppliers. Accordingly, previous reports have shown that differences in PPI can reflect differences in substrains based on the specific location of the supplier (Swerdlow *et al.*, 2000). Nevertheless, these potential concerns are tempered by preliminary studies in both laboratories, which essentially confirmed our findings on the three rat strains irrespective of the locations and source of the animals.

In summary, our study has identified a heuristic experimental platform to test the selective role of D<sub>1</sub> receptors in producing gating deficits in rats. As stated above, PPI deficits are an endophenotypic feature of several neuropsychiatric disorders, including schizophrenia and Tourette syndrome. Thus, our results may prove valuable in the testing of specific hypotheses on the direct involvement of D<sub>1</sub> receptors in rat models of these disorders.

## Acknowledgements

The authors are highly grateful to Dr. Neal Swerdlow for his valuable scientific and editorial suggestions, as well as data communications. The authors would also like to thank

Hunter Strathman, Kelsey Joliff, Alexandria Ruby and Lyle Harte for their valuable support in the execution of the experiments. This work was partially supported by grants from the National Institute of Mental Health (NIH R01 MH104603, to M. B.), Tourette Syndrome Association (to M. B.), Kansas Strategic Initiative Grant (to M. B.) and a sub-award from the NIH grant P20 GM103638 (to M. B.). The authors are indebted to the EU COST Action CM1103 'Structure-based drug design for diagnosis and treatment of neurological diseases: dissecting and modulating complex function in the monoaminergic systems of the brain' for supporting their international collaboration. None of the institutions had any further role in the decision to submit the paper for publication.

## Author contributions

L. J. M. executed part of the experiments, analysed the data and wrote the first draft of the manuscript. R. F., A. P. and R. P. executed part of the experiments. P. D. designed the studies and provided the funds for part of the experiments. M. B. designed the studies, provided the funds for the study, analysed the data and wrote the final version of the manuscript.

## Conflict of interest

The authors certify that they have no conflict of interest in relation to the content of this article.

## References

- Abi-Dargham A (2003). Probing cortical dopamine function in schizophrenia: what can D<sub>1</sub> receptors tell us? *World Psychiatry* 2: 166–171.
- Alexander SPH, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Sharman JL Spedding M *et al.* (2013) *The Concise Guide to PHARMACOLOGY* 2013/14: G Protein-Coupled Receptors. *Br J Pharmacol* 170: 1459–1581.
- Altman PL, Katz DD (1979). *Inbred and Genetically Defined Strains of Laboratory Animals, Part 1: Mouse And Rat*, 1st edn. Federation of American Societies for Experimental Biology: Bethesda, MD.
- Amicarelli F, Gasbarri A, Masciocco L, Pompili A, Pacitti C, Carlucci G *et al.* (1999). The effect of intrastriatal injection of liposome-entrapped tyrosinase on the dopamine levels in the rat brain. *Cell Mol Biol* 45: 1093–1097.
- Andersen PH, Jansen JA (1990). Dopamine receptor agonists: selectivity and dopamine D<sub>1</sub> receptor efficacy. *Eur J Pharmacol: Mol Pharmacol* 188: 335–347.
- Arnt J, Bogeso KP, Hyttel J, Meier E (1988). Relative dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptor affinity and efficacy determine whether dopamine agonists induce hyperactivity or oral stereotypy in rats. *Pharmacol Toxicol* 62: 121–130.
- de Beaufrepaire R, Labelle A, Naber D, Jones BD, Barnes TR (1995). An open trial of the D<sub>1</sub> antagonist SCH 39166 in six cases of acute psychotic states. *Psychopharmacology (Berl)* 121: 323–327.

- Bitsios P, Giakoumaki SG, Frangou S (2005). The effects of dopamine agonists on prepulse inhibition in healthy men depend on baseline PPI values. *Psychopharmacology (Berl)* 182: 144–152.
- Bortolato M, Aru GN, Fa M, Frau R, Orru M, Salis P *et al.* (2005). Activation of D1, but not D2 receptors potentiates dizocilpine-mediated disruption of prepulse inhibition of the startle. *Neuropsychopharmacology* 30: 561–574.
- Braff DL, Geyer MA, Swerdlow NR (2001). Human studies of prepulse inhibition of startle: normal subjects, patient groups, and pharmacological studies. *Psychopharmacology (Berl)* 156: 234–258.
- Burgess HA, Granato M (2007). Sensorimotor gating in larval zebrafish. *J Neurosci* 27: 4984–4994.
- Den Boer JA, van Megen HJ, Fleischhacker WW, Louwerens JW, Slaap BR, Westenberg HG *et al.* (1995). Differential effects of the D1-DA receptor antagonist SCH39166 on positive and negative symptoms of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* 121: 317–322.
- Deng H, Gao K, Jankovic J (2012). The genetics of Tourette syndrome. *Nat Rev Neurol* 8: 203–213.
- Dulawa SC, Geyer MA (1996). Psychopharmacology of prepulse inhibition in mice. *Chin J Physiol* 39: 139–146.
- Dunah AW, Standaert DG (2001). Dopamine D1 receptor-dependent trafficking of striatal NMDA glutamate receptors to the postsynaptic membrane. *J Neurosci* 21: 5546–5558.
- Feifel D (1999). Individual differences in prepulse inhibition of startle as a measure of individual dopamine function. *Behav Neurosci* 113: 1020–1029.
- Frau R, Orru M, Fa M, Casti A, Manunta M, Fais N *et al.* (2007). Effects of topiramate on the prepulse inhibition of the acoustic startle in rats. *Neuropsychopharmacology* 32: 320–331.
- Freudenberger CB (1932). A comparison of the Wistar albino and the Long-Evans hybrid strain of the Norway rat. *Am J Anat* 50: 293–349.
- Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ Jr *et al.* (1990). D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250: 1429–1432.
- Geyer MA, Braff DL (1987). Startle habituation and sensorimotor gating in schizophrenia and related animal models. *Schizophr Bull* 13: 643–668.
- Geyer MA, Swerdlow NR (1998). Measurement of startle response, prepulse inhibition, and habituation. *Curr Protoc Neurosci* 8, unit 8.7.
- Geyer MA, Swerdlow NR, Mansbach RS, Braff DL (1990). Startle response models of sensorimotor gating and habituation deficits in schizophrenia. *Brain Res Bull* 25: 485–498.
- Geyer MA, Krebs-Thomson K, Braff DL, Swerdlow NR (2001). Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology (Berl)* 156: 117–154.
- Gilbert DL, Budman CL, Singer HS, Kurlan R, Chipkin RE (2014). A D1 receptor antagonist, ecopipam, for treatment of tics in Tourette syndrome. *Clin Neuropharmacol* 37: 26–30.
- Gnanalingham KK, Hunter AJ, Jenner P, Marsden CD (1995). Stimulation of adenylate cyclase activity by benzazepine D-1 dopamine agonists with varying efficacies in the 6-hydroxydopamine lesioned rat – relationship to circling behaviour. *Biochem Pharmacol* 49: 1185–1193.
- Himmler BT, Stryjek R, Modlinska K, Derksen SM, Pisula W, Pellis SM (2013). How domestication modulates play behavior: a comparative analysis between wild rats and a laboratory strain of *Rattus norvegicus*. *J Comp Psychol* 127: 453–464.
- Hoffman HS, Ison JR (1980). Reflex modification in the domain of startle: I. Some empirical findings and their implications for how the nervous system processes sensory input. *Psychol Rev* 87: 175–189.
- Jiang HK, McGinty JF, Hong JS (1990). Differential modulation of striatonigral dynorphin and enkephalin by dopamine receptor subtypes. *Brain Res* 507: 57–64.
- Karlsson P, Smith L, Farde L, Härnryd C, Sedvall G, Wiesel FA (1995). Lack of apparent antipsychotic effect of the D1-dopamine receptor antagonist SCH39166 in acutely ill schizophrenic patients. *Psychopharmacology (Berl)* 121: 309–316.
- Kendler KS, Diehl SR (1993). The genetics of schizophrenia: a current, genetic-epidemiologic perspective. *Schizophr Bull* 19: 261–285.
- Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010). Animal research: Reporting *in vivo* experiments: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol* 160: 1577–1579.
- Mansbach RS, Geyer MA, Braff DL (1988). Dopaminergic stimulation disrupts sensorimotor gating in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 94: 507–514.
- McGrath J, Drummond G, McLachlan E, Kilkenny C, Wainwright C (2010). Guidelines for reporting experiments involving animals: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol* 160: 1573–1576.
- Meloni EG, Davis M (1999). Enhancement of the acoustic startle response in rats by the dopamine D1 receptor agonist SKF 82958. *Psychopharmacology (Berl)* 144: 373–380.
- Meyer ME, Shults JM (1993). Dopamine D1 receptor family agonists, SK&F38393, SK&F77434, and SK&F82958, differentially affect locomotor activities in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 46: 269–274.
- Murray AM, Waddington JL (1990). New putative selective agonists at the D-1 dopamine receptor: behavioural and neurochemical comparison of CY 208–243 with SK&F 101384 and SK&F 103243. *Pharmacol Biochem Behav* 35: 105–110.
- Nikulina EM, Avgustinovich DF, Popova NK (1992). Selection for reduced aggressiveness towards man and dopaminergic activity in Norway rats. *Aggress Behav* 18: 65–72.
- O'Boyle KM, Gaitanopoulos DE, Brenner M, Waddington JL (1989). Agonist and antagonist properties of benzazepine and thienopyridine derivatives at the D1 dopamine receptor. *Neuropharmacology* 28: 401–405.
- O'Rourke JA, Scharf JM, Yu D, Pauls DL (2009). The genetics of Tourette syndrome: a review. *J Psychosom Res* 67: 533–545.
- Pawson AJ, Sharman JL, Benson HE, Faccenda E, Alexander SP, Buneman OP *et al.*; NC-IUPHAR (2014). The IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY: an expert-driven knowledge base of drug targets and their ligands. *Nucl. Acids Res* 42 (Database Issue): D1098–D1106.
- Peng RY, Mansbach RS, Braff DL, Geyer MA (1990). A D2 dopamine receptor agonist disrupts sensorimotor gating in rats. Implications for dopaminergic abnormalities in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 3: 211–218.
- Ralph RJ, Caine SB (2005). Dopamine D1 and D2 agonist effects on prepulse inhibition and locomotion: comparison of Sprague-Dawley

- rats to Swiss-Webster, 129X1/SvJ, C57BL/6J, and DBA/2J mice. *J Pharmacol Exp Ther* 312: 733–741.
- Ralph RJ, Caine SB (2007). Effects of selective dopamine D1-like and D2-like agonists on prepulse inhibition of startle in inbred C3H/HeJ, SPRET/Eij, and CAST/Eij mice. *Psychopharmacology (Berl)* 191: 731–739.
- Ralph-Williams RJ, Lehmann-Masten V, Otero-Corchon V, Low MJ, Geyer MA (2002). Differential effects of direct and indirect dopamine agonists on prepulse inhibition: a study in D1 and D2 receptor knock-out mice. *J Neurosci* 22: 9604–9611.
- Ralph-Williams RJ, Lehmann-Masten V, Geyer MA (2003). Dopamine D1 rather than D2 receptor agonists disrupt prepulse inhibition of startle in mice. *Neuropsychopharmacology* 28: 108–118.
- Rasmussen K, Gates MR, Burger JE, Czachura JF (1997). The novel atypical antipsychotic olanzapine, but not the CCK-B antagonist LY288513, blocks apomorphine-induced disruption of pre-pulse inhibition. *Neurosci Lett* 222: 61–64.
- Robertson HA, Paul ML, Moratalla R, Graybiel AM (1991). Expression of the immediate early gene *c-fos* in basal ganglia: induction by dopaminergic drugs. *Can J Neurol Sci* 18: 380–383.
- Saint Marie RL, Neary AC, Shoemaker JM, Swerdlow NR (2006). The effects of apomorphine and D-amphetamine on striatal *c-fos* expression in Sprague-Dawley and Long Evans rats and their F1 progeny. *Brain Res* 1119: 203–214.
- Searle AG (1990). Comparative genetics of albinism. *Ophthalmic Paediatr Genet* 11: 159–164.
- Shilling PD, Saint Marie RL, Shoemaker JM, Swerdlow NR (2008). Strain differences in the gating-disruptive effects of apomorphine: relationship to gene expression in nucleus accumbens signaling pathways. *Biol Psychiatry* 63: 748–758.
- Shoemaker JM, Saint Marie RL, Bongiovanni MJ, Neary AC, Tochen LS, Swerdlow NR (2005). Prefrontal D1 and ventral hippocampal N-methyl-D-aspartate regulation of startle gating in rats. *Neuroscience* 135: 385–394.
- Sullivan PF (2005). The genetics of schizophrenia. *PLoS Med* 2: e212.
- Swerdlow NR, Braff DL, Masten VL, Geyer MA (1990). Schizophrenic-like sensorimotor gating abnormalities in rats following dopamine infusion into the nucleus accumbens. *Psychopharmacology (Berl)* 101: 414–420.
- Swerdlow NR, Keith VA, Braff DL, Geyer MA (1991). Effects of spiperone, raclopride, SCH 23390 and clozapine on apomorphine inhibition of sensorimotor gating of the startle response in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 256: 530–536.
- Swerdlow NR, Braff DL, Geyer MA (1999). Cross-species studies of sensorimotor gating of the startle reflex. *Ann N Y Acad Sci* 877: 202–216.
- Swerdlow NR, Martinez ZA, Hanlon FM, Platten A, Farid M, Auerbach P *et al.* (2000). Toward understanding the biology of a complex phenotype: rat strain and substrain differences in the sensorimotor gating-disruptive effects of dopamine agonists. *J Neurosci* 20: 4325–4336.
- Swerdlow NR, Platten A, Kim YK, Gaudet I, Shoemaker J, Pitcher L *et al.* (2001). Sensitivity to the dopaminergic regulation of prepulse inhibition in rats: evidence for genetic, but not environmental determinants. *Pharmacol Biochem Behav* 70: 219–226.
- Swerdlow NR, Shoemaker JM, Platten A, Pitcher L, Goins J, Auerbach PP (2004). Heritable differences in the dopaminergic regulation of sensorimotor gating. I. Apomorphine effects on startle gating in albino and hooded outbred rat strains and their F1 and N2 progeny. *Psychopharmacology (Berl)* 174: 441–451.
- Swerdlow NR, Kuczenski R, Goins JC, Crain SK, Ma LT, Bongiovanni MJ *et al.* (2005). Neurochemical analysis of rat strain differences in the startle gating-disruptive effects of dopamine agonists. *Pharmacol Biochem Behav* 80: 203–211.
- Swerdlow NR, Krupin AS, Bongiovanni MJ, Shoemaker JM, Goins JC, Hammer RP Jr (2006). Heritable differences in the dopaminergic regulation of behavior in rats: relationship to D2-like receptor G-protein function. *Neuropsychopharmacology* 31: 721–729.
- Swerdlow NR, Shoemaker JM, Bongiovanni MJ, Neary AC, Tochen LS, Saint Marie RL (2007). Strain differences in the disruption of prepulse inhibition of startle after systemic and intra-accumbens amphetamine administration. *Pharmacol Biochem Behav* 87: 1–10.
- Swerdlow NR, Weber M, Qu Y, Light GA, Braff DL (2008). Realistic expectations of prepulse inhibition in translational models for schizophrenia research. *Psychopharmacology (Berl)* 199: 331–388.
- Varty GB, Higgins GA (1998). Dopamine agonist-induced hypothermia and disruption of prepulse inhibition: evidence for a role of D3 receptors? *Behav Pharmacol* 9: 445–455.
- Wan FJ, Taaid N, Swerdlow NR (1996). Do D1/D2 interactions regulate prepulse inhibition in rats? *Neuropsychopharmacology* 14: 265–274.
- Wang JQ, McGinty JF (1996). Scopolamine augments *c-fos* and *zip/268* messenger RNA expression induced by the full D(1) dopamine receptor agonist SKF-82958 in the intact rat striatum. *Neuroscience* 72: 601–616.
- Williams GV, Goldman-Rakic PS (1995). Modulation of memory fields by dopamine D1 receptors in prefrontal cortex. *Nature* 376: 572–575.
- Wirtshafter D, Asin KE (1994). Interactive effects of stimulation of D1 and D2 dopamine receptors on *fos*-like immunoreactivity in the normosensitive rat striatum. *Brain Res Bull* 35: 85–91.
- Xu Y, Stokes AH, Roskoski R Jr, Vrana KE (1998). Dopamine, in the presence of tyrosinase, covalently modifies and inactivates tyrosine hydroxylase. *J Neurosci Res* 54: 691–697.
- Zhang J, Forkstam C, Engel JA, Svensson L (2000). Role of dopamine in prepulse inhibition of acoustic startle. *Psychopharmacology (Berl)* 149: 181–188.





Published in final edited form as:

CNS Neurosci Ther. 2014 July ; 20(7): 679–684. doi:10.1111/cns.12261.

## Positive allosteric modulation of GABA<sub>B</sub> receptors ameliorates sensorimotor gating in rodent models

Roberto Frau<sup>1,2</sup>, Valentina Bini<sup>1,2</sup>, Giuliano Pillolla<sup>1</sup>, Pari Malherbe<sup>3</sup>, Alessandra Pardu<sup>1</sup>, Andrew W. Thomas<sup>4</sup>, Paola Devoto<sup>1,2</sup>, and Marco Bortolato<sup>2,5,6</sup>

<sup>1</sup>“Guy Everett” Laboratory, Dept. of Biomedical Sciences, University of Cagliari, Italy

<sup>2</sup>Tourette Syndrome Center, University of Cagliari, Italy

<sup>3</sup>F. Hoffmann-La Roche AG, pRED, Pharma Research & Early Development, DTA Neuroscience, Grenzacherstrasse 124, Basel, Switzerland, CH4070

<sup>4</sup>F. Hoffmann-La Roche AG, pRED, Pharma Research & Early Development, Small Molecule Research, Grenzacherstrasse 124, Basel, Switzerland, CH4070

<sup>5</sup>Dept. of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy, University of Kansas, Lawrence (KS), USA

<sup>6</sup>Consortium for Translational Research on Aggression and Drug Abuse (ConTRADA), University of Kansas, Lawrence (KS), USA

### Abstract

**Background**—Converging evidence points to the involvement of  $\gamma$ -amino-butyric acid B receptors (GABA<sub>B</sub>Rs) in the regulation of information processing. We previously showed that GABA<sub>B</sub>R agonists exhibit antipsychotic-like properties in rodent models of sensorimotor gating deficits, as measured by the prepulse inhibition (PPI) of the acoustic startle reflex. The therapeutic potential of these agents, however, is limited by their neuromuscular side effects; thus, in the present study we analyzed whether *rac*-BHFF, a potent GABA<sub>B</sub>R positive allosteric modulator (PAM), could counter spontaneous and pharmacologically induced PPI deficits across various rodent models.

**Methods**—We tested the antipsychotic effects of *rac*-BHFF on the PPI deficits caused by the *N*-methyl-D-aspartate glutamate receptor antagonist dizocilpine, in Sprague-Dawley rats and C57BL/6 mice. Furthermore, we verified whether *rac*-BHFF ameliorated the spontaneous PPI impairments in DBA/2J mice.

**Results**—*rac*-BHFF dose-dependently countered the PPI deficits across all three models, in a fashion akin to the GABA<sub>B</sub>R agonist baclofen and the atypical antipsychotic clozapine; in contrast with these compounds, however, *rac*-BHFF did not affect startle magnitude.

---

Corresponding author: Marco Bortolato, MD PhD, Dept. of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy, University of Kansas, 1251 Wescoe Hall Dr., Rm 5040, Lawrence, KS 66044, Tel.:785-864-1936; Fax: 785-864-5219, bortolato@ku.edu.  
Roberto Frau and Valentina Bini contributed equally to this work

No conflicts of interest were declared by any authors. None of the institutions had any further role in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication.

**Conflicts of interest:** Pari Malherbe and Andrew W Thomas are employees of Hoffmann-La Roche.

**Conclusions**—The present data further support the implication of GABA<sub>B</sub>Rs in the modulation of sensorimotor gating, and point to their PAMs as a novel promising tool for antipsychotic treatment, with fewer side effects than GABA<sub>B</sub>R agonists.

### Keywords

GABA<sub>B</sub> receptors; prepulse inhibition of the startle; sensorimotor gating; schizophrenia; NMDA receptors; DBA/2J mice

## Introduction

Ample evidence shows that  $\gamma$ -amino-butyric acid (GABA), the main inhibitory neurotransmitter in the CNS, is implicated in schizophrenia pathogenesis [1-3]. In particular, several clinical investigations have documented deficits in the expression of the metabotropic GABA<sub>B</sub> receptors (GABA<sub>B</sub>Rs) in the cortex and hippocampus of schizophrenia patients [4-6]. The mechanisms supporting the involvement of GABA<sub>B</sub>Rs in psychotic disorders remain elusive; however, recent findings suggest that the dysfunction of this receptors in the cortex leads to alterations of glutamate signaling and excitatory/inhibitory imbalances [7-8], which contribute to the aberrant information processing and cognitive deficits in schizophrenia [9-10].

In keeping with this background, our group and others showed that the prototypical GABA<sub>B</sub>R agonist baclofen (BAC) countered the disruption of prepulse inhibition (PPI) of the acoustic startle reflex produced by the blockade of N-methyl-D-aspartate glutamate receptors (NMDARs) in rats [11-12] and mice [13]. This endophenotype is widely regarded as a heuristic index of sensorimotor gating, the cognitive function that enables pre-attentive information filtering and governs the detection of perceptual salience [14]; notably, PPI deficits are featured in schizophrenia and related neuropsychiatric disorders [15-16].

In subsequent studies, we found that BAC rescued the marked deficits in sensorimotor gating present in DBA/2J mice [17], a strain that features antipsychotic-sensitive PPI deficits [18].

These findings collectively highlight GABA<sub>B</sub>R as a highly promising target for antipsychotic treatment. Indeed, Daskalakis and George [19] hypothesized that GABA<sub>B</sub>R activation may be the mechanism underlying the unique ability of the antipsychotic agent clozapine (CLO) in reducing the severity of negative symptoms in schizophrenia. While BAC monotherapy does not elicit significant antipsychotic effects [20], preliminary studies have documented its therapeutic effectiveness as an adjunctive treatment [21-22]. The therapeutic employment of BAC in schizophrenia is limited by several factors, including its poor ability to cross the blood-brain barrier, its short latency of action [23], as well as its potentially severe side effects, including muscle flaccidity, sedation, loss of reflexes, and, at higher dosages, bradycardia, respiratory depression, hypothermia and coma [24]. A new class of GABA<sub>B</sub>R positive allosteric modulators (PAMs) has been recently developed [25] to harness the therapeutic potential of GABA<sub>B</sub>R activation without eliciting the side effects of BAC. The mechanism of these compounds is based on the enhancement of the effects of

GABA on GABA<sub>B</sub>Rs [26-27]. One of the most potent drugs in this family, *rac*-BHFF [(*R,S*)-5,7-di-*tert*-butyl-3-hydroxy-3-trifluoromethyl-3*H*-benzofuran-2-one] [25], has been shown to produce behavioral effects without altering motor coordination and nervous reflexes, and with a much better safety index than GABA<sub>B</sub>R agonists [25; 28-31]. Here we show that *rac*-BHFF elicited antipsychotic-like effects on the pharmacologically induced and spontaneous gating deficits in rodent models, as assessed through the paradigm of the prepulse inhibition (PPI) of the acoustic startle reflex; although these effects were comparable to those of BAC and CLO, *rac*-BHFF did not induce the same alterations of startle reflex associated with these drugs.

## Materials and methods

### Animals

We used behaviorally-naïve male Sprague-Dawley rats weighing between 250-300 g, and male DBA/2J and C57BL/6J between 18-24 g. Animals were housed 4/cage in a room maintained at a temperature of 22°C and kept under an artificial 12/12-h light/dark cycle. Animals were given *ad libitum* access to food and water and handled for 5 min daily to minimize experimental stress. All experimental procedures were approved by the ethical committee of the University of Cagliari and carried out in strict accordance with the guidelines for experimental animals care [European Economic Community (86/609; DL 27/01/92, number 110)].

### Drugs

*rac*-BHFF (Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland) was suspended in a mixture containing Cremophor EL, 1,2-propanediol and distilled water (4:1:30 ratio) and administered intragastrically (per os, PO) at an injection volume of 10 ml/kg. The NMDAR antagonist dizocilpine (DIZ; Sigma-Aldrich, Milan, Italy) was dissolved in 0.9% saline and administered subcutaneously (SC). BAC (Tocris Cookson, Bristol, UK) was dissolved in saline and administered intraperitoneally (IP). CLO (Sigma-Aldrich) was dissolved in a single drop of 1 N HCl and diluted with saline; the pH was adjusted to 7 with NaHCO<sub>3</sub>. Parenteral injections were administered in injection volumes of 1 ml/kg for rats and 10ml/kg for mice.

### Experimental procedures

Acoustic startle reflex and PPI were measured in 4 sound-attenuated chambers (Med Associates, St Albans, USA) with fan ventilation. Each chamber consisted of a Plexiglas cylinder (9 cm diameter for rats and 3.2 cm diameter for mice) mounted on a piezoelectric accelerometric platform and connected to an analogue-digital converter. Background noise and acoustic bursts were conveyed by two separate speakers, properly spaced from the cylinder so as to produce a variation of sound within 1 dB across it. Both speakers and startle cylinders were connected to a main PC computer, which detected and analyzed all chamber variables by means of specific software. Before every testing session, acoustic stimuli and mechanical responses were calibrated via specific devices supplied by Med Associates.

The experimental procedure was based on the protocols described in Frau *et al* [32]. Briefly, three days before the experiment, animals went through a brief baseline startle session. Animals were exposed to 70 dB background white noise for a 5 min acclimation, followed by presentation to a randomized sequence of twelve 40 ms acoustic pulses of 115 dB, interposed with three trials in which an 82 dB prepulse preceded the 115 dB pulse by 100 ms. Subsequently, treatment groups were established so that average startle responses and % PPI (calculated as:  $100 - [(mean\ startle\ amplitude\ for\ prepulse + pulse\ trials / mean\ startle\ amplitude\ for\ pulse\ alone\ trials) \times 100]$ ) were equivalent across groups. On the testing day, each animal was placed in the cylinder for a 5-min acclimation to 70 dB background white noise, which continued for the remainder of the entire session. The session consisted of three consecutive blocks of trials. Unlike the first and the third block, during which animals were presented with only five pulse-alone trials of 115 dB, the second block displayed a pseudorandom sequence of 50 trials, including 12 pulse-alone trials, 30 trials of pulse preceded by 74, 78 or 86 dB prepulses (ten for each level of prepulse loudness) and eight no stimulus trials, where only background noise was delivered. Intertrial intervals (ITI) were selected randomly between 10 and 15 s. The duration of pulses and prepulses were 40 and 20 ms, respectively. Prepulse-pulse delay amounted to 100 ms.

### Data analysis

Normality and homoscedasticity of data were verified by Kolmogorov-Smirnov and Bartlett's tests. Data were compared across groups by one-way or two-way ANOVAs, as appropriate. As no interaction between prepulse levels and treatment were found in the statistical analysis, %PPI values were collapsed across prepulse intensity to represent average %PPI. *Post-hoc* analyses were performed using Tukey's test with Spjøtvoll-Stoline correction. Significance threshold was set at 0.05.

## Results

### Effects of *rac*-BHFF on the PPI deficits induced by DIZ in Sprague Dawley rats

In the first experiment, we investigated whether *rac*-BHFF pretreatment could prevent the PPI disruption induced by the NMDAR antagonist DIZ in Sprague Dawley rats. Animals were pretreated with either *rac*-BHFF (25-50 mg/kg, PO) or vehicle (control) and sixty minutes later were given an injection of either DIZ (0.1 mg/kg, SC) or saline (control). Animals were subjected to PPI testing five min after the last treatment.

No significant differences in startle amplitude were found between pretreatment-treatment groups (Fig. 1A) [Interaction:  $F_{2,47}=0.10$ ; NS]. Conversely, we found a significant pretreatment  $\times$  treatment interaction (Fig. 1B) [Interaction:  $F_{2,47}=4.62$ ,  $P<0.05$ ] between groups. *Post-hoc* analyses revealed that the highest dose of *rac*-BHFF significantly reversed DIZ-induced PPI deficits ( $P<0.05$ ; Tukey's test).

In contrast, BAC (5 mg/kg, IP) produced a significant reduction in startle amplitude [Main effect:  $F_{1,37}=9.44$ ;  $P<0.01$ ] (Fig. 1A); furthermore, it significantly prevented the PPI impairments caused by DIZ [Interaction:  $F_{1,37}=4.89$ ;  $P<0.05$ ;  $P<0.05$  for vehicle-DIZ vs BAC-DIZ comparisons] (Fig. 1B). As expected, CLO (5 mg/kg, IP) elicited similar effects,

with a general reduction of startle magnitude [Main effect:  $F_{1,37}=7.17$ ;  $P<0.05$ ] (Fig. 1A) and a significant reversal of DIZ-mediated PPI deficits [Interaction:  $F_{1,37}=5.27$ ;  $P<0.05$ ;  $P<0.05$  for vehicle-DIZ vs CLO-DIZ comparisons] (Fig. 1B).

### Effects of *rac*-BHFF on the PPI deficits induced by DIZ in C57BL/6J mice

Next, we studied whether *rac*-BHFF (6.25-12.5 mg/kg, PO) exhibited antipsychotic-like effects in C57BL/6J mice treated with DIZ (0.3mg/kg, IP). In parallel with our results on rats, no differences were found between groups for startle amplitude (Fig. 2A) [Interaction:  $F_{2,59} = 1.99$ , NS]; however, we detected a marked pretreatment  $\times$  treatment interaction (Fig. 2B) [ $F_{2,52}=5.32$ ,  $P<0.01$ ]. Specifically, the PPI-disruptive effects of DIZ ( $P<0.01$ ) were prevented by *rac*-BHFF treatment at a dose of 12.5mg/kg ( $P<0.001$ ; Tukey's test). As previously shown [17], BAC (5 mg/kg, IP) did not affect startle amplitude in C57BL/6J mice (Fig.2A); notably, the PPI analysis indicated main effects for both pre-treatment (BAC) [ $F_{1,41}=7.00$ ;  $P<0.05$ ] and treatment (DIZ) [ $F_{1,41}=8.13$ ;  $P<0.01$ ], but no significant interactions [ $F_{1,41}=2.32$ ; NS] (Fig. 2B). Conversely, CLO (5 mg/kg, IP) reduced startle magnitude [Main effect:  $F_{1,41}=7.84$ ;  $P<0.01$ ] (Fig.2A) and significantly countered the PPI disruption induced by DIZ [Interaction:  $F_{1,41}=4.81$ ;  $P<0.05$ ;  $P<0.05$  for vehicle-DIZ vs CLO-DIZ comparisons] (Fig. 2B).

### Effects of *rac*-BHFF on the spontaneous PPI deficit displayed by DBA/2J strain of mice

In the last experiment we evaluated the intrinsic effects of *rac*-BHFF on the spontaneous low PPI baseline displayed by DBA/2J mice. Animals were treated with VEH or *rac*-BHFF (6.25-12.5 mg/kg, PO) and subjected to PPI sessions sixty minutes later. The GABA<sub>B</sub>R PAM did not elicit any changes in startle amplitude at any dose (Fig. 3A) [ $F_{2,35}=0.99$ , NS]. In contrast, low PPI in DBA mice was countered by *rac*-BHFF [ $F_{2,35}=4.63$   $P<0.05$ ], specifically at the dose of 12.5 mg/kg ( $P<0.05$ ; Tukey's test) (Fig. 3B). BAC and CLO failed to affect startle amplitude, but significantly countered DIZ-induced PPI deficits [BAC:  $F_{1,20}=10.28$ ;  $P<0.01$ ; CLO:  $F_{1,20}=12.36$ ;  $P<0.01$ ] (Fig. 3B).

## Discussion

The results of this study showed that *rac*-BHFF, a potent GABA<sub>B</sub>R PAM, dose-dependently reversed DIZ-induced PPI deficits in both SD rats and C57BL/6J mice, and rescued the PPI impairments displayed by DBA/2J mice. Overall, these effects were akin to those elicited by the GABA<sub>B</sub>R agonist BAC and the atypical antipsychotic CLO, and substantially confirm previous findings by our group and others [11-13; 18] on the therapeutic potential of GABA<sub>B</sub>R activators on sensorimotor gating deficits induced by NMDAR blockade. Notably, in contrast with BAC and CLO, *rac*-BHFF did not significantly reduce the magnitude of startle reflex, irrespective of the animal model and dose. It is also worth mentioning that the same doses of *rac*-BHFF that elicited antipsychotic-like effects in our models also failed to affect locomotor responses or other spontaneous behavioral manifestations in the home cage [unpublished observations]. Taken together, our findings complement previous preclinical data on the beneficial effects of GABA<sub>B</sub>R PAMs [33-34] and highlight this class of compound as a novel putative avenue for antipsychotic therapy with fewer side effects than GABA<sub>B</sub>R antagonists.

One of the key problems in the potential employment of BAC as an add-on treatment lies in the exacerbation of locomotor impairments and sedative effects caused by dopamine D<sub>2</sub> receptor antagonism; indeed, in preliminary studies we observed that the association of BAC and antipsychotic drugs, such as CLO and haloperidol, was not suitable for behavioral studies in rodents, in view of the serious impairments in neuromuscular coordination produced by such combinations. From this perspective, GABA<sub>B</sub>R PAMs may afford a safer and tolerable alternative as antipsychotic adjunctive therapies for schizophrenia or related disorders. Future clinical and preclinical studies are warranted to evaluate this interesting perspective and validate the potential usefulness of *rac*-BHFF and similar agents in the treatment of psychoses.

The PPI of the acoustic response refers to the reduction in the response amplitude to a sudden and intense startling stimulus [pulse], when it is immediately preceded by a weaker non-startling pre-stimulus [35]. This phenomenon is widely regarded as a dependable index of sensorimotor gating integrity, and is typically impaired in schizophrenia [17]. In rodents, DIZ and other NMDAR antagonists produce marked PPI deficits, which are sensitive to CLO and other atypical, but not typical, antipsychotics [36-38]. The effects of NMDAR antagonists on sensorimotor gating are in line with the well-known psychotomimetic effects of these drugs [39] and other alterations of informational processing [40].

Although the mechanisms by which DIZ and other NMDAR blockers impair PPI remain unclear, several studies point to a key role of the prefrontal cortex (PFC) and hippocampal regions in these phenomena [12; 41]. These areas are characterized by a large density of pre- and postsynaptic GABA<sub>B</sub>Rs, which finely regulate basal glutamatergic and dopaminergic functions [42]. Accordingly, disturbances in GABA<sub>B</sub>R expression or function may affect informational salience by altering the inhibitory/excitatory balance of several neurotransmitter systems in corticolimbic regions.

It has been reported that MK-801 and PCP stimulate cortical glutamate release in PFC and hippocampus [43]. In this scenario, *rac*-BHFF could counteract the disinhibition of neuronal activity produced by exaggerated NMDAR stimulation in these areas or, alternatively, modulate distinct forebrain pathways under the control of non-NMDA glutamatergic receptors, such as AMPA and Kainate [44]. Alternatively, *rac*-BHFF may counter DIZ-mediated PPI-deficits by acting on the pallidotegmental nucleus (PTn). This predominantly GABAergic area exhibits high levels of GABA<sub>B</sub>Rs and acts as an interface between the brainstem and forebrain regions implicated in PPI regulation regions [45]. Accordingly, DIZ has been recently shown to induce PPI deficits through alterations of the giant neurons of this region; notably, GABA<sub>B</sub>R activation reversed these impairments by stabilizing the hyperactivation of these nuclei [13].

*rac*-BHFF also significantly ameliorated the PPI deficits on DBA/2J mice, a strain characterized by spontaneous gating impairments sensitive to antipsychotics [19], as well as other phenotypes reminiscent of schizophrenia symptoms, such as poor exploration as well as high aggression and social avoidance [46-49].

The antipsychotic-like actions of *rac*-BHFF in this murine strain may be related to their reduced expression of GABA<sub>B</sub>Rs and NMDARs across the cortex and hippocampus, in comparison with C57BL/6J mice [18; 50].

Several limitations in the present study should be acknowledged. First, our analysis was limited to the behavioral analysis of startle reflex and PPI, but did not include the testing of other paradigms with great relevance to the negative and cognitive symptoms of schizophrenia-spectrum disorders, such as object recognition and social interaction test [51-52]. Second, we did not evaluate the effects of *rac*-BHFF in animal models with high translational validity with respect to schizophrenia, such as DISC1- and neuregulin1-deficient mice, or rodents subjected to chronic administration of DIZ or other NMDAR antagonists, which may have better simulated the neurobiological impairments associated with schizophrenia [53-58]. Third, our research did not encompass testing of GABA<sub>B</sub> negative allosteric modulators or antagonists, which may be essential for a full definition of the role of these receptors in schizophrenia-related endophenotypes.

Although further investigations are needed to address these limitations, our findings extend and support for the role of GABA<sub>B</sub>Rs in the pathophysiology of psychiatric disorders associated with sensorimotor gating disturbances, and point to PAMs of these targets as interesting therapeutic tools to treat cognitive deficits and negative symptoms in schizophrenia.

## Acknowledgments

The present study was supported by National Institute of Health (NIH) grant R21HD070611 (to M.B.) and a Research Grant from the Tourette Syndrome Association (to MB). This study was also partially supported by sub-awards (to M.B.) from the NIH grants P20 GM103638 and UL1 TR000001 (formerly UL1RR033179), awarded to the University of Kansas and University of Kansas Medical Center. The authors are indebted to the EU COST Action CM1103 “Structure-based drug design for diagnosis and treatment of neurological diseases: dissecting and modulating complex function in the monoaminergic systems of the brain” for supporting their international collaboration. We are grateful to Sean Godar for his insightful comments on the manuscript, and Romina Pes for her valuable support in the execution of the experiments.

## References

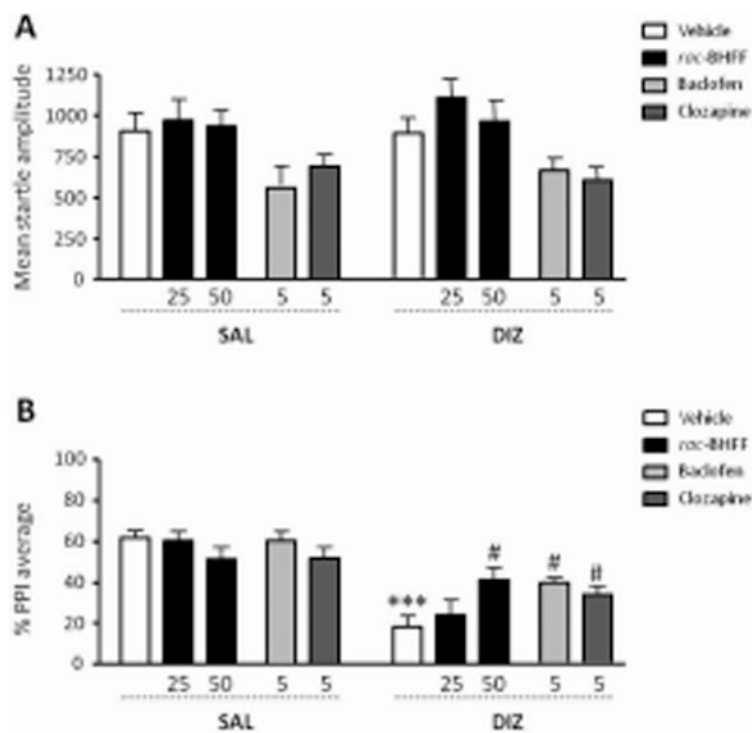
1. Benes FM, Berretta S. GABAergic interneurons: implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacol.* 2001; 25:1–27.
2. Blum BP, Mann JJ. The GABAergic system in schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2002; 5:159–79. [PubMed: 12135541]
3. Wassef A, Baker J, Kochan LD. GABA and schizophrenia: a review of basic science and clinical studies. *J Clin Psychopharmacol.* 2003; 23:601–40. [PubMed: 14624191]
4. Mizukami K, Ishikawa M, Hidaka S, Iwakiri M, Sasaki M, Iritani S. Immunohistochemical localization of GABAB receptor in the entorhinal cortex and inferior temporal cortex of schizophrenic brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2002; 26:393–6. [PubMed: 11817519]
5. Ishikawa M, Mizukami K, Iwakiri M, Asada T. Immunohistochemical and immunoblot analysis of gamma-aminobutyric acid B receptor in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia and bipolar disorder. *Neurosci Lett.* 2005; 383:272–7. [PubMed: 15955420]
6. Fatemi SH, Folsom TD, Thuras PD. Deficits in GABA(B) receptor system in schizophrenia and mood disorders: a postmortem study. *Schizophr Res.* 2011; 128:37–43. [PubMed: 21303731]

7. Gandal MJ, Sisti J, Klook K, Ortinski PI, Leitman V, Liang Y, Thieu T, et al. GABAB-mediated rescue of altered excitatory-inhibitory balance, gamma synchrony and behavioral deficits following constitutive NMDAR-hypofunction. *Transl Psychiatry*. 2012; 2:e142. [PubMed: 22806213]
8. Hasan A, Wobrock T, Grefkes C, Labusga M, Levold K, Schneider-Axmann T, Falkai P, et al. Deficient inhibitory cortical networks in antipsychotic-naive subjects at risk of developing first-episode psychosis and first-episode schizophrenia patients: a cross-sectional study. *Biol Psychiatry*. 2012; 72:744–51. [PubMed: 22502988]
9. Kehrer C, Maziashvili N, Dugladze T, Gloveli T. Altered Excitatory-Inhibitory Balance in the NMDA-Hypofunction Model of Schizophrenia. *Front Mol Neurosci*. 2008; 8:1–7.
10. Yizhar O, Fenno LE, Prigge M, Schneider F, Davidson TJ, O'Shea DJ, Sohal VS, et al. Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature*. 2011; 477:171–8. [PubMed: 21796121]
11. Bortolato M, Frau R, Aru GN, Orrù M, Gessa GL. Baclofen reverses the reduction in prepulse inhibition of the acoustic startle response induced by dizocilpine, but not by apomorphine. *Psychopharmacology*. 2004; 171:322–30. [PubMed: 13680072]
12. Fejgin K, Pålsson E, Wass C, Finnerty N, Lowry J, Klamer D. Prefrontal GABA(B) receptor activation attenuates phencyclidine-induced impairments of prepulse inhibition: involvement of nitric oxide. *Neuropsychopharmacology*. 2009; 7:1673–84. [PubMed: 19145229]
13. Arai S, Takuma K, Mizoguchi H, Ibi D, Nagai T, Takahashi K, Kamei H, et al. Involvement of pallidotegmental neurons in methamphetamine- and MK-801-induced impairment of prepulse inhibition of the acoustic startle reflex in mice: reversal by GABAB receptor agonist baclofen. *Neuropsychopharmacology*. 2008; 33:3164–75. [PubMed: 18354384]
14. Vollenweider FX, Geyer MA. A systems model of altered consciousness: integrating natural and drug-induced psychoses. *Brain Res Bull*. 2001; 56:495–507. [PubMed: 11750795]
15. Braff DL, Geyer MA, Swerdlow NR. Human studies of prepulse inhibition of startle: normal subjects, patient groups, and pharmacological studies. *Psychopharmacology*. 2001; 156:234–58. [PubMed: 11549226]
16. Koch M. Clinical relevance of animal models of schizophrenia. *Suppl Clin Neurophysiol*. 2013; 62:113–20. [PubMed: 24053035]
17. Bortolato M, Frau R, Orrù M, Piras AP, Fà M, Tuveri A, Puligheddu M, et al. Activation of GABA(B) receptors reverses spontaneous gating deficits in juvenile DBA/2J mice. *Psychopharmacology*. 2007; 194:361–9. [PubMed: 17604981]
18. Olivier B, Leahy C, Mullen T, Paylor R, Groppi VE, Sarnyai Z, Brunner D. The DBA/2J strain and prepulse inhibition of startle: a model system to test antipsychotics? *Psychopharmacology*. 2001; 156:284–90. [PubMed: 11549230]
19. Daskalakis ZJ, George TP. Clozapine, GABA(B), and the treatment of resistant schizophrenia. *Clin Pharmacol Ther*. 2009; 86:442–6. [PubMed: 19626000]
20. Gulmann NC, Bahr B, Andersen B, Eliassen HM. A double-blind trial of baclofen against placebo in the treatment of schizophrenia. *Acta Psychiatr Scand*. 1976; 54:287–93. [PubMed: 793304]
21. Frederiksen PK. Letter: Baclofen in the treatment of schizophrenia. *Lancet*. 1975; 1:702. [PubMed: 47138]
22. Schöpf J, Hucker H. Baclofen in the treatment of schizophrenia: a pilot study. *Pharmakopsychiatr Neuropsychopharmakol*. 1977; 10:89–91. [PubMed: 360234]
23. Bowery NG. GABAB receptor: a site of therapeutic benefit. *Curr Opin Pharmacol*. 2006; 6:37–43. [PubMed: 16361115]
24. Sullivan R, Hodgman MJ, Kao L, Tormoehlen LM. Baclofen overdose mimicking brain death. *Clin Toxicol (Phila)*. 2012; 50:141–4. [PubMed: 22292975]
25. Malherbe P, Masciadri R, Norcross RD, Knoflach F, Kratzeisen C, Zenner MT, Kolb Y, et al. Characterization of (R,S)-5,7-di-tert-butyl-3-hydroxy-3-trifluoromethyl-3H-benzofuran-2-one as a positive allosteric modulator of GABAB receptors. *Br J Pharmacol*. 2008; 154:797–811. [PubMed: 18536733]
26. Urwyler S, Mosbacher J, Lingenhoehl K, Heid J, Hofstetter K, Froestl W, Bettler B, et al. Positive allosteric modulation of native and recombinant gamma-aminobutyric acid(B) receptors by 2,6-Di-

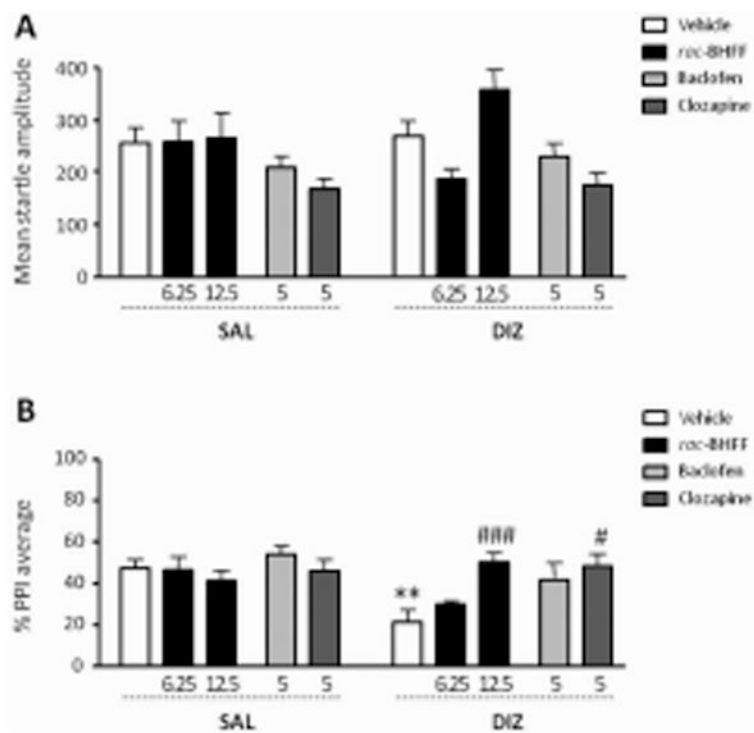


- tert-butyl-4-(3-hydroxy-2,2-dimethyl-propyl)-phenol (CGP7930) and its aldehyde analog CGP13501. *Mol Pharmacol*. 2001; 60:963–71. [PubMed: 11641424]
27. Urwyler S, Pozza MF, Lingenhoehl K, Mosbacher J, Lampert C, Froestl W, Koller M, et al. N,N'-Dicyclopentyl-2-methylsulfanyl-5-nitro-pyrimidine-4,6-diamine (GS39783) and structurally related compounds: novel allosteric enhancers of gamma-aminobutyric acidB receptor function. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003; 307:322–30. [PubMed: 12954816]
  28. Carai MA, Colombo G, Froestl W, Gessa GL. In vivo effectiveness of CGP7930, a positive allosteric modulator of the GABAB receptor. *Eur J Pharmacol*. 2004; 504:213–6. [PubMed: 15541424]
  29. Cryan JF, Kelly PH, Chaperon F, Gentsch C, Mombereau C, Lingenhoehl K, Froestl W, et al. Behavioral characterization of the novel GABAB receptor-positive modulator GS39783 (N,N'-dicyclopentyl-2-methylsulfanyl-5-nitro-pyrimidine-4,6-diamine): anxiolytic-like activity without side effects associated with baclofen or benzodiazepines. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004; 310:952–63. [PubMed: 15113848]
  30. Jacobson LH, Cryan JF. Evaluation of the anxiolytic-like profile of the GABAB receptor positive modulator CGP7930 in rodents. *Neuropharmacology*. 2008; 54:854–62. [PubMed: 18328507]
  31. Koek W, France CP, Cheng K, Rice KC. GABAB receptor-positive modulators: enhancement of GABAB receptor agonist effects in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010; 335:163–71. [PubMed: 20628000]
  32. Frau R, Orrù M, Fà M, Casti A, Manunta M, Fais N, Mereu G, et al. Effects of topiramate on the prepulse inhibition of the acoustic startle in rats. *Neuropsychopharmacology*. 2007; 32:320–31. [PubMed: 16794573]
  33. Koek W, France CP, Cheng K, Rice KC. Effects of the GABAB receptor-positive modulators CGP7930 and rac-BHFF in baclofen- and  $\gamma$ -hydroxybutyrate-discriminating pigeons. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012; 341:369–76. [PubMed: 22319197]
  34. Koek W, Cheng K, Rice KC. Discriminative stimulus effects of the GABAB receptor-positive modulator rac-BHFF: comparison with GABAB receptor agonists and drugs of abuse. *J Pharmacol Exp Ther*. 2013; 344:553–60. [PubMed: 23275067]
  35. Swerdlow NR, Geyer MA. Using an animal model of deficient sensorimotor gating to study the pathophysiology and new treatments of schizophrenia. *Schizophr Bull*. 1998; 24:285–301. [PubMed: 9613626]
  36. Bakshi VP, Swerdlow NR, Geyer MA. Clozapine antagonizes phencyclidine-induced deficits in sensorimotor gating of the startle response. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994; 2:787–94. [PubMed: 7965797]
  37. Bakshi VP, Geyer MA. Antagonism of phencyclidine-induced deficits in prepulse inhibition by the putative atypical antipsychotic olanzapine. *Psychopharmacology*. 1995; 2:198–201. [PubMed: 8848537]
  38. Geyer MA, Krebs-Thomson K, Braff DL, Swerdlow NR. Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology*. 2001; 156:117–54. [PubMed: 11549216]
  39. Javitt DC, Zukin SR. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 1991; 10:1301–8. [PubMed: 1654746]
  40. Umbricht D, Schmid L, Koller R, Vollenweider FX, Hell D, Javitt DC. Ketamine-induced deficits in auditory and visual context-dependent processing in healthy volunteers: implications for models of cognitive deficits in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 2000; 57:1139–47. [PubMed: 11115327]
  41. Bakshi VP, Geyer MA. Multiple limbic regions mediate the disruption of prepulse inhibition produced in rats by the noncompetitive NMDA antagonist dizocilpine. *J Neurosci*. 1998; 18:8394–401. [PubMed: 9763482]
  42. Bowery NG. Historical perspective and emergence of the GABAB receptor. *Adv Pharmacol*. 2010; 58:1–18. [PubMed: 20655476]
  43. Roenker NL, Gudelsky GA, Ahlbrand R, Horn PS, Richtand NM. Evidence for involvement of nitric oxide and GABA(B) receptors in MK-801-stimulated release of glutamate in rat prefrontal cortex. *Neuropharmacology*. 2012; 63:575–81. [PubMed: 22579658]

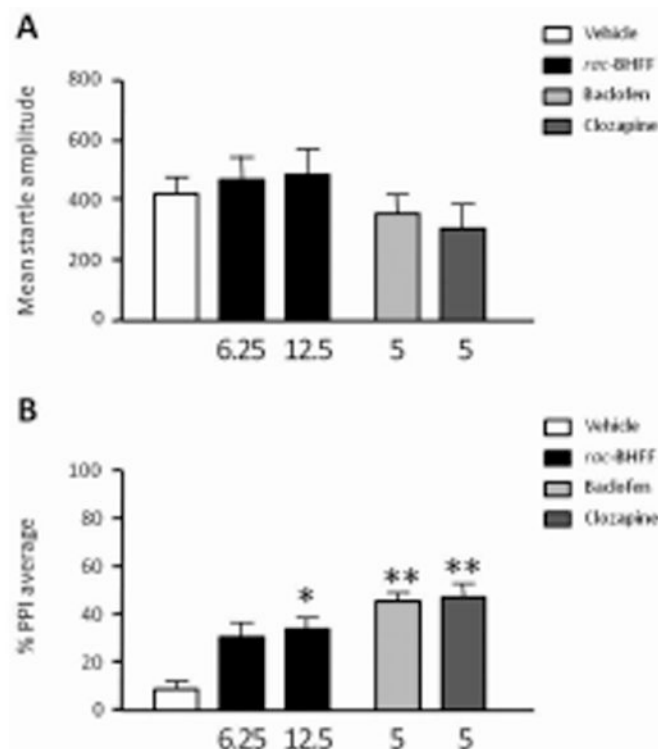
44. Moghaddam B, Adams B, Verma A, Daly D. Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *J Neurosci*. 1997; 17:2921–7. [PubMed: 9092613]
45. Takahashi K, Nagai T, Kamei H, Maeda K, Matsuya T, Arai S, Mizoguchi H, Yoneda Y, Nabeshima T, Takuma K, Yamada K. Neural circuits containing pallidotegmental GABAergic neurons are involved in the prepulse inhibition of the startle reflex in mice. *Biol Psychiatry*. 2007; 62:148–57. [PubMed: 17027927]
46. Elias PK, Elias MF, Eleftheriou BE. Emotionality, exploratory behavior, and locomotion in aging inbred strains of mice. *Gerontologia*. 1975; 1:46–55. [PubMed: 1140561]
47. Randt CT, Blizard DA, Friedman E. Early life undernutrition and aggression in two mouse strains. *Dev Psychobiol*. 1975; 3:275–9. [PubMed: 1241773]
48. Anisman H. Differential effects of scopolamine and D-amphetamine on avoidance: Strain interactions. *Pharmacol Biochem Behav*. 1975; 3:809–17. [PubMed: 1208621]
49. Stavnes KL, Sprott RL. Genetic analysis of active avoidance performance in mice. *Psychol Rep*. 1975; 36:515–21. [PubMed: 1144596]
50. Lu Y, Wehner JM. Enhancement of contextual fear-conditioning by putative (+/-)-alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) receptor modulators and N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonists in DBA/2J mice. *Brain Res*. 1997; 768:197–207. [PubMed: 9369316]
51. Rajagopal L, Massey BW, Huang M, Oyamada Y, Meltzer HY. The novel object recognition test in rodents in relation to cognitive impairment in schizophrenia. *Curr Pharm Des*. 2013 in press.
52. Jones CA, Watson DJ, Fone KC. Animal models of schizophrenia. *Br J Pharmacol*. 2011; 164:1162–94. [PubMed: 21449915]
53. Hikida T, Jaaro-Peled H, Seshadri S, Oishi K, Hookway C, Kong S, Wu D, et al. Dominant-negative DISC1 transgenic mice display schizophrenia-associated phenotypes detected by measures translatable to humans. *Proc Natl Acad Sci*. 2007; 104:14501–6. [PubMed: 17675407]
54. Karl T, Duffy L, Scimone A, Harvey RP, Schofield PR. Altered motor activity, exploration and anxiety in heterozygous neuregulin 1 mutant mice: implications for understanding schizophrenia. *Genes Brain Behav*. 2007; 6:677–87. [PubMed: 17309661]
55. Kvajo M, McKellar H, Arguello PA, Drew LJ, Moore H, MacDermott AB, et al. A mutation in mouse Disc1 that models a schizophrenia risk allele leads to specific alterations in neuronal architecture and cognition. *Proc Natl Acad Sci*. 2008; 105:7076–81. [PubMed: 18458327]
56. Neill JC, Barnes S, Cook S, Grayson B, Idris NF, McLean SL, Snigdha S, et al. Animal models of cognitive dysfunction and negative symptoms of schizophrenia: focus on NMDA receptor antagonism. *Pharmacol Ther*. 2010; 128:419–32. [PubMed: 20705091]
57. Savage S, Kehr J, Olson L, Mattsson A. Impaired social interaction and enhanced sensitivity to phencyclidine-induced deficits in novel object recognition in rats with cortical cholinergic denervation. *Neuroscience*. 2011; 195:60–9. [PubMed: 21875653]
58. Meltzer HY, Rajagopal L, Huang M, Oyamada Y, Kwon S, Horiguchi M. Translating the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist model of schizophrenia to treatments for cognitive impairment in schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2013; 16:2181–94. [PubMed: 24099265]



**Figure 1.** Effects of *rac*-BHFF on the mean startle amplitude (A) and prepulse inhibition deficits (B) induced by dizocilpine (DIZ, 0.1 mg/kg, SC) in Sprague Dawley rats, compared to baclofen and clozapine. All doses are given in milligrams per kilogram and are indicated below the horizontal axis. Values represent mean  $\pm$  SEM for each treatment. Percent prepulse inhibition (PPI) values were collapsed across all three prepulse intensities (4, 8, and 16 dB above 70 dB background noise). For all experimental groups, n=8-12. SAL, saline. \*\*\*, P<0.001, compared to VEH+SAL group; #, P<0.05, compared to VEH+DIZ group. For further details, see text.



**Figure 2.** Effects of *rac*-BHFF on the mean startle amplitude (A) and spontaneously low prepulse inhibition deficits (B) induced by dizocilpine (DIZ, 0.3 mg/kg, IP) in C57BL/6J mice, compared to baclofen and clozapine. All doses are given in milligrams per kilogram and are indicated below the horizontal axis. Values represent mean  $\pm$  SEM for each treatment. Percent prepulse inhibition (PPI) values were collapsed across all three prepulse intensities (4, 8, and 16 dB above 70 dB background noise). For all experimental groups,  $n=8-12$ . SAL, saline. \*\*,  $P<0.01$ , compared to VEH+SAL group; ###,  $P<0.001$ , #,  $P<0.05$ , compared to VEH+DIZ group. For further details, see text.



**Figure 3.** Effects of *rac*-BHFF on the mean startle amplitude (A) and spontaneous prepulse inhibition deficits (B) displayed by DBA/2J mice, compared to baclofen and clozapine. All doses are given in milligrams per kilogram and are indicated below the horizontal axis. Values represent mean  $\pm$  SEM for each treatment. Percent prepulse inhibition (PPI) values were collapsed across all three prepulse intensities (4, 8, and 16 dB above 70 dB background noise). For all experimental groups,  $n=8-10$ . \*\*,  $P<0.01$ , compared to VEH group. For further details, see text.