

# ***Farmacologia cellulare e molecolare***

***Prof. P Romualdi, PhD***

## **III PARTE**

### **Trasmissione neuronale**

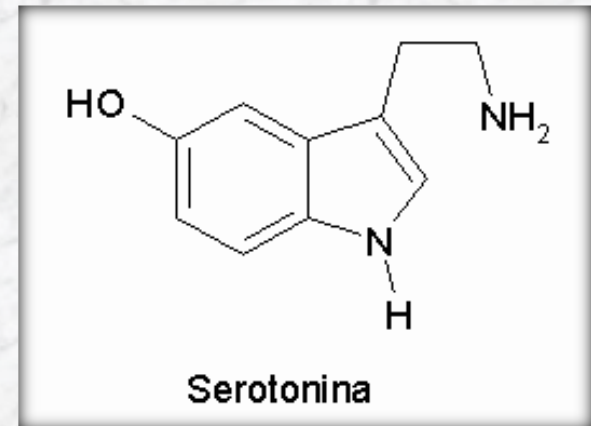
**Sistema della serotonina - vecchie e nuove  
evidenze**

- **Nel 1930 l'italiano Vittorio Erspamer scopre per primo l'enteramina nelle cellule della mucosa intestinale**
- negli anni successivi il gruppo del **Prof. Page caratterizzò un fattore presente nel siero dotato di attività vasocostrittrice venne chiamato Serotonina**

**SOLO PIU' TARDI SI COMPRESO CHE RAPPRESENTAVANO LA STESSA MOLECOLA**

La serotonina (5-HT) è un **neurotrasmettitore monoaminico**

**È principalmente coinvolta nella regolazione dell'umore.**



**Le più alte concentrazioni di 5HT :** Coinvolta nella modulazione di una vasta gamma di processi fisiologici e fisiopatologici all'interno del nostro organismo.

1. **nella parete intestinale** = nelle cellule enterocromaffini (il 90% della 5HT totale)

2. **nel sangue ad elevata concentrazione**

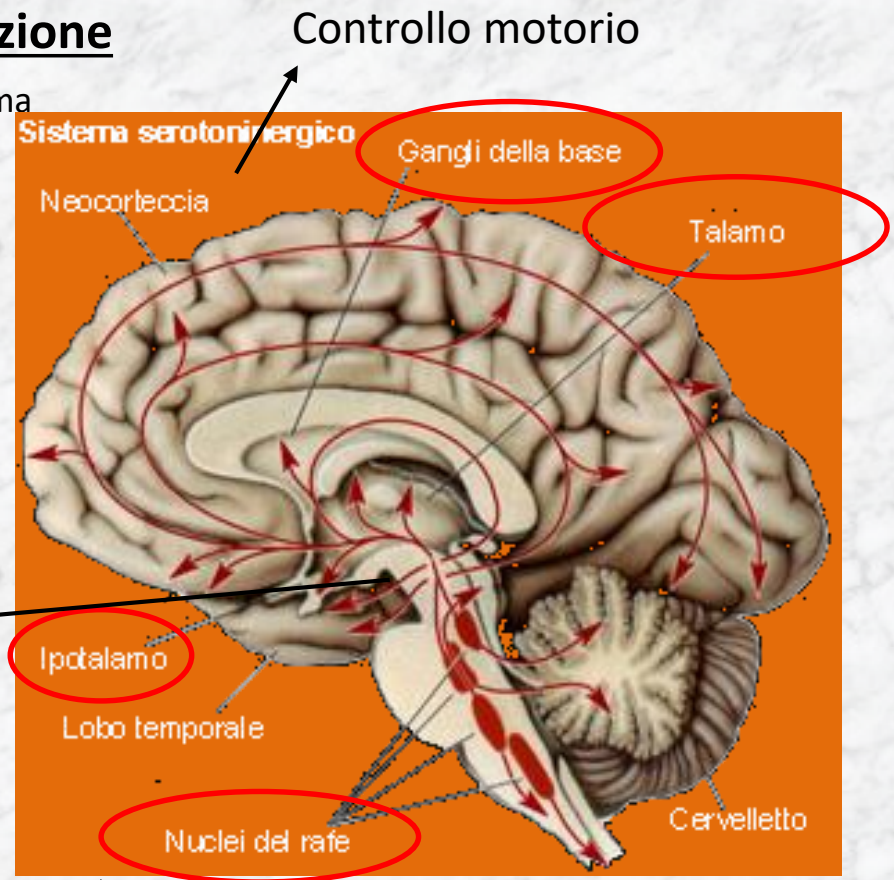
**nelle piastrine** (che la accumulano dal plasma tramite trasporto attivo e la rilasciano in seguito all'aggregazione nei siti di danno Tissutale = vasocostrittrice)

3. **nel SNC in specifiche aree del Mesencefalo nei neuroni serotoninergici**

**AMIGDALA**  
Ansia e paura

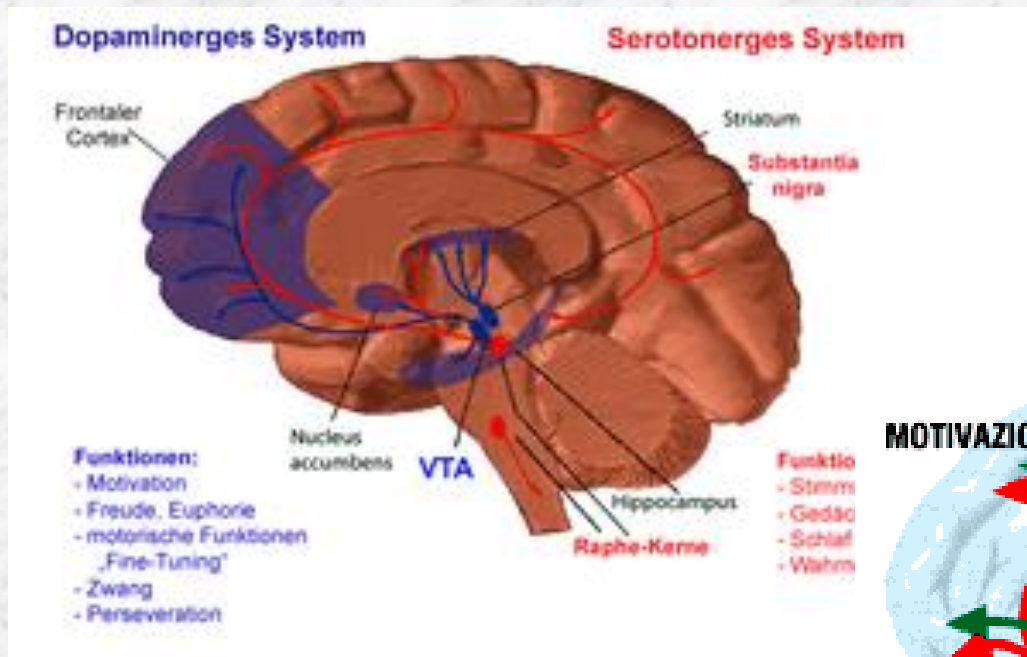
Appetito e  
comportamento sessuale

Vomito e dolore

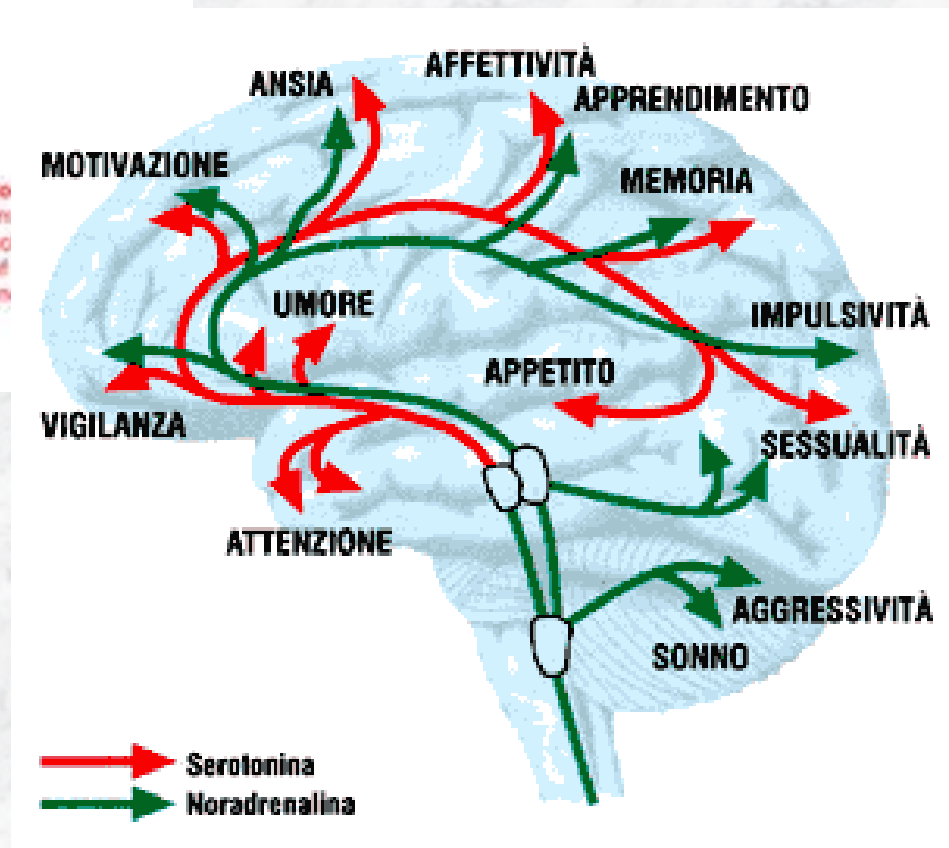


I corpi cellulari dei neuroni 5HT sono molto abbondanti nei nuclei del rafe e proiettano a zone diffuse della corteccia

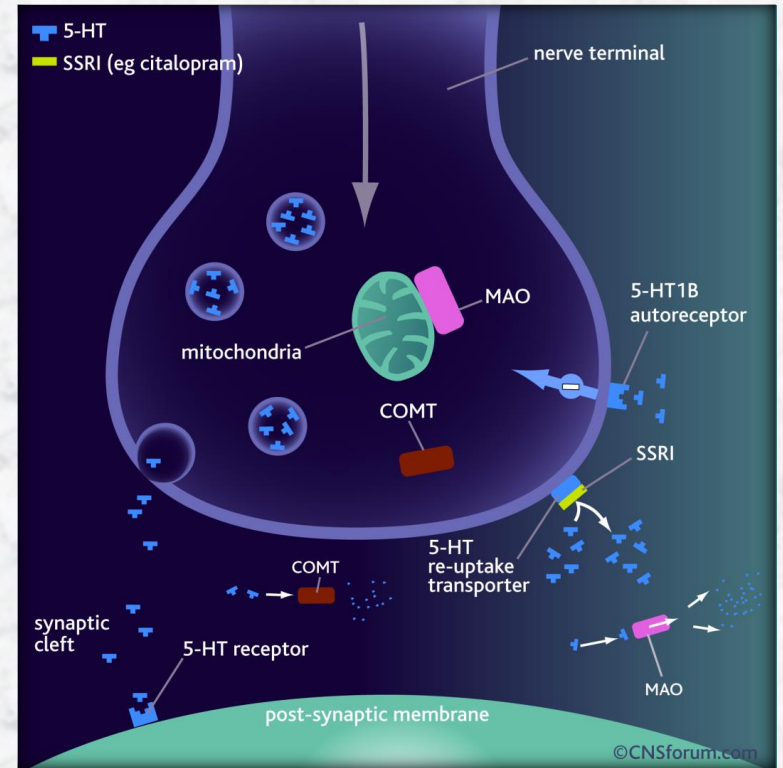
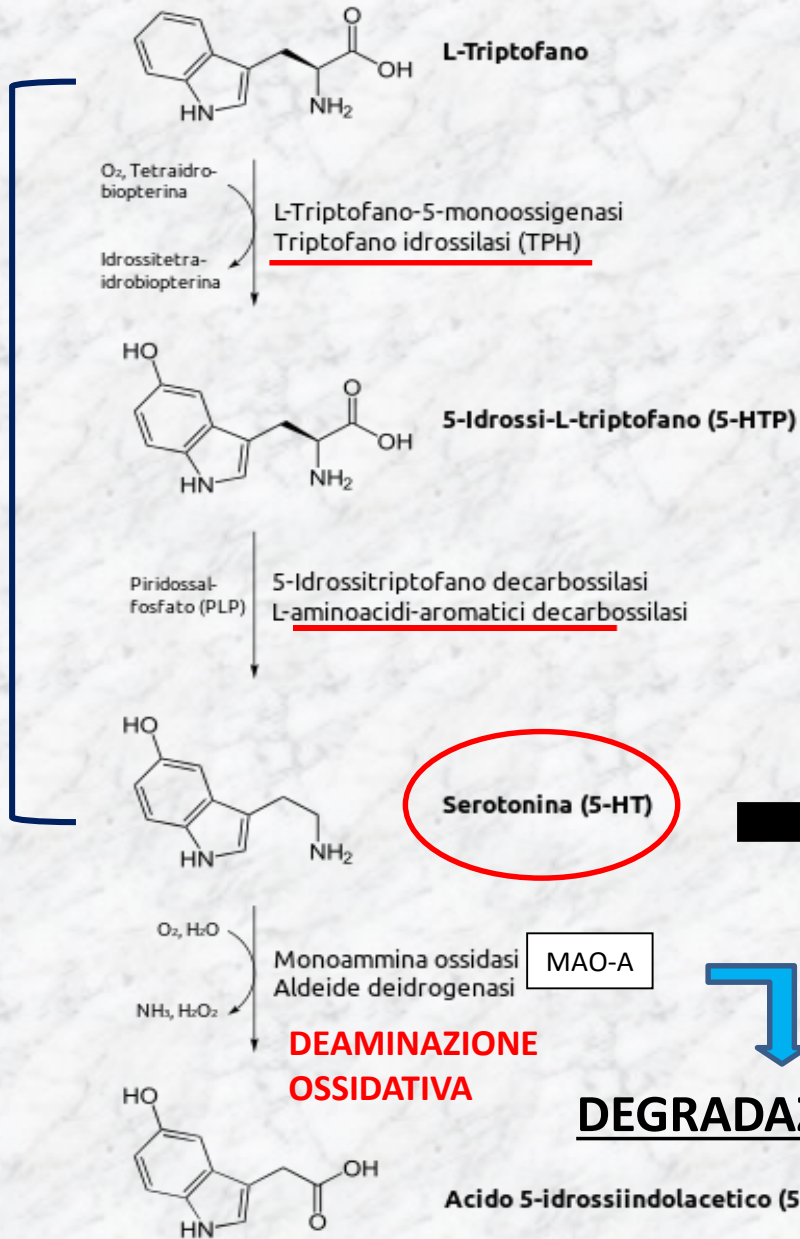
La trasmissione serotonergica è complessa perché questo sistema è connesso sia **anatomicamente** che **funzionalmente** con altri sistemi neurotrasmettitoriali



L'attività di farmaci attivi su questo sistema può essere accompagnata da **modificazioni dello stato funzionale di altri, e viceversa.**



# Biosintesi della Serotonina



**ESOCITOSI con meccanismo  
Ca<sup>2+</sup>/dipendente**

**IMMAGAZZINAMENTO  
VMAT**

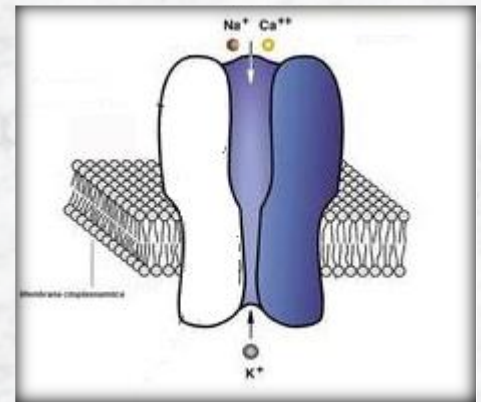
**RICAPTAZIONE tramite SERT**

# I RECETTORI 5-HT sono 7 (di cui 6 accoppiati a Prot-G)

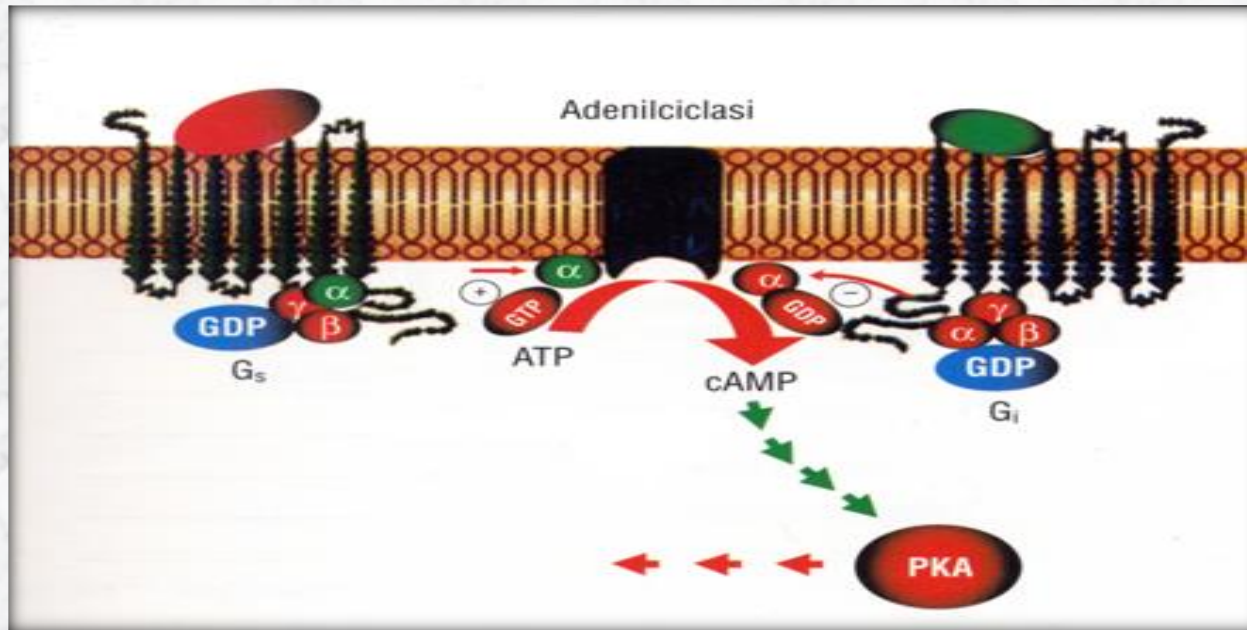
- **5-HT<sub>1</sub> (sottotipi A-B-C-D-E-F)** Accoppiati a prot Gi/o = ↓ livelli di cAMP
- **5-HT<sub>2</sub> (sottotipi A-B-C)** Accoppiati a prot Gq/ = ↑ livelli di IP<sub>3</sub>
- **5-HT<sub>4</sub>** Accoppiati a prot Gs = ↑ livelli di cAMP
- **5-HT<sub>5</sub>** Accoppiati a prot Gi/o = ↓ livelli di cAMP

- **5-HT<sub>3</sub> (sottotipo A-B-C-D-E-Ea)** IONOTROPO →
- **5-HT<sub>6</sub>** ] Accoppiati a prot Gs = ↑ livelli di cAMP
- **5-HT<sub>7</sub>** ]

**PENTAMERO**  
**INGRESSO DI Ca<sup>2+</sup> - Na<sup>+</sup>**



**USCITA K<sup>+</sup>**



## **Nel SNC la serotonina svolge un ruolo importante**

- **Nella regolazione dell'umore**
- **Nella regolazione del sonno**
- **Nella regolazione della temperatura corporea, dell'appetito e della sessualità**
- **Nel dolore**
- **A livello cardiovascolare e gastrico**
- **Nel controllo di altre fibre neuronali inibendo il rilascio di altri mediatori**



## Modulazione del rilascio:

- da altri neuro-trasmittitori che attivano rec. presinaptici non serotonergici (muscarinici, GABAergici,  $\alpha 2$ )
- da autocettori Serotonergici presinaptici  $\longrightarrow$  **5-HT<sub>1D/1A</sub> inibiscono la liberazione**

## Modulazione della ricaptaz. e immagazzinamento:

- **trasportatore (SERT)** = una sua variante genetica lo rende un fattore di vulnerabilità per alcune malattie psichiatriche
- **reserpina e tetrabenazina** = **inattivano il trasportatore vescicolare delle monoammine VMAT che co-trasporta il neurotrasmettitore dal citoplasma alle vescicole che così viene metabolizzato dalla MAO-A**

# AZIONE inibitoria sul VMAT di

**Reserpina**

e

**Tetrabenazina**

---

**Azione di lunga durata** a causa del suo legame scarsamente reversibile con il trasportatore

**È usata come anti-ipertensivo in associazione con farmaci diuretici** perché a livello periferico inibisce l'immagazzinamento anche di DA e NA

**Era usata come anti-psicotico** per disturbi bipolari e schizofrenia  
**Abbandonata perché causa depressione grave**

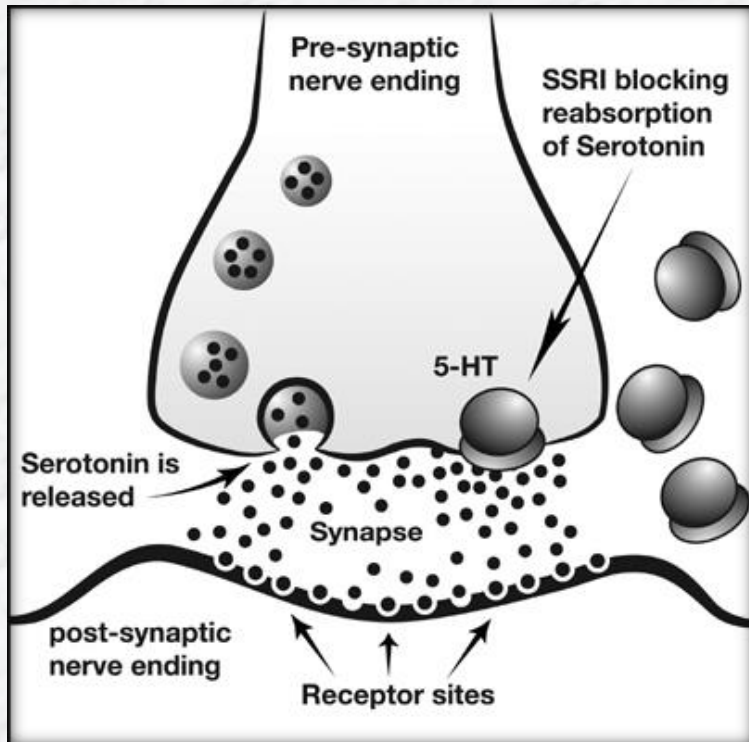
Agisce con lo **stesso meccanismo** della Reserpina ma **la sua durata d'azione è minore perché il legame è più debole**

**E' usata per disturbi del movimento, Ipercinesia → perché essere associata con bassi livelli di DA e NA**  
(attività motoria involontaria non coordinata)

# 5HT e malattie neuropsichiatriche: DEPRESSIONE

Sappiamo che diversi farmaci si legano reversibilmente al SERT, legando un sito presente sul versante extra cellulare e inibiscono la ricaptazione della 5HT, sono:

- Farmaci **antidepressivi triciclici** (*Amitriptilina, Imipramina, Nortriptilina*)
- Farmaci **antidepressivi non triciclici**  
SSRI = *Fluoxetina, Paroxetina, Citalopram*  
SNRI = *Venlafaxina e Duloxetina*



**Inibiscono il re-uptake della 5-HT  
aumentandone i livelli nella fessura  
sinaptica**

**Molto usati nella terapia di  
disturbi  
dell'umore e dell' ansia**

# SSRI = Inibitori selettivi del Re-uptake della Serotonina

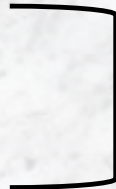
---

Utilizzati in terapia per depressioni gravi, disturbo ossessivo-compulsivo che inibendo il re-uptake fanno in modo che la 5-HT rimanga per più tempo nello spazio sinaptico

## Gli EFFETTI COLLATERALI sono di lieve entità

- Recenti studi parlano di disfunzioni sessuali :

- ↓ della libido
- impotenza



Possono comparire sia in concomitanza del trattamento che dopo sospensione da esso

- **sindrome da sospensione** = vertigini, astenia (riduz. forza muscolare) e sintomi che ricalcano la stessa malattia curata  
ANSIA-AGITAZIONE e INSONNIA

# 5HT nelle malattie psichiatriche: ANSIOLITICI e nella modulazione del comportamento

- **Agonisti parziali 5HT<sub>1A</sub>** = autocettori riduzione della frequenza di scarica  
Inibizione Serotoninergica = **effetto ansiolitico**

**AZAPIRONI** (Buspirone, Gepirone) = **UTILIZZATI PER DISTURBI DELL'ANSIA GENERALIZZATA.**

**Non hanno nulla a che fare con il mecc. delle BDZ (agiscono su GABA<sub>A</sub>), non provocano sedazione**

- topi k.o. per il rec 5HT-1b  
modifiche a carico di MAO-A

sono più aggressivi


la serotonina  
**sopprime i comportamenti  
eccessivamente aggressivi**

# ANTAGONISTI 5-HT<sub>2</sub> utilizzati come antipsicotici

Usati per trattare schizofrenia e disturbo bipolare, minori eff collat extrapiramidali ma anche questi possono bloccare la via dopaminergica

- **Antipsicotici tipici o convenzionali** (Clorpromozina, Aloperidolo) = eff. collaterali irreversibili come discinesia tardiva
- **Antipsicotici atipici o di II generaz** (Risperidone , Sertindiolo, Clozapina, Olanzapina, Quetiapina)

**Ritanserina**  antagon. 5-HT<sub>2A/2C</sub> utilizzato in terapia combinata con antipsicotici tipici per ridurre gli effetti extrapiramidali

**Metisergide**  antagon 5-HT<sub>2</sub> per la profilassi dell'emicrania

**Il sistema della serotonina partecipa al controllo della percezione del dolore sia a livello periferico che centrale**

**È stato dimostrato che pazienti che presentano disturbi dell'umore mostrano anche una aumentata percezione del dolore legata ad alterazioni nella modulazione serotoninergica del dolore**

# Ruolo nel controllo della percezione del dolore

In un **evento infiammatorio** provoca il **rilascio di 5-HT** che sensitizza fibre nervose periferiche che trasportano informazioni nocicettive al SNC = inietta a livello cutaneo provoca dolore

**TRAMADOLO**= *Agonista oppioide  $\mu$*   
*Inibit. re-uptake NA e **Aumenta rilascio 5-HT***

**TAPENTADOLO**= *Agonista oppioide  $\mu$*   
*Inibit. re-uptake NA*

**ATTIVAZIONE DEL SISTEMA INIBITORIO DISCENDENTE**

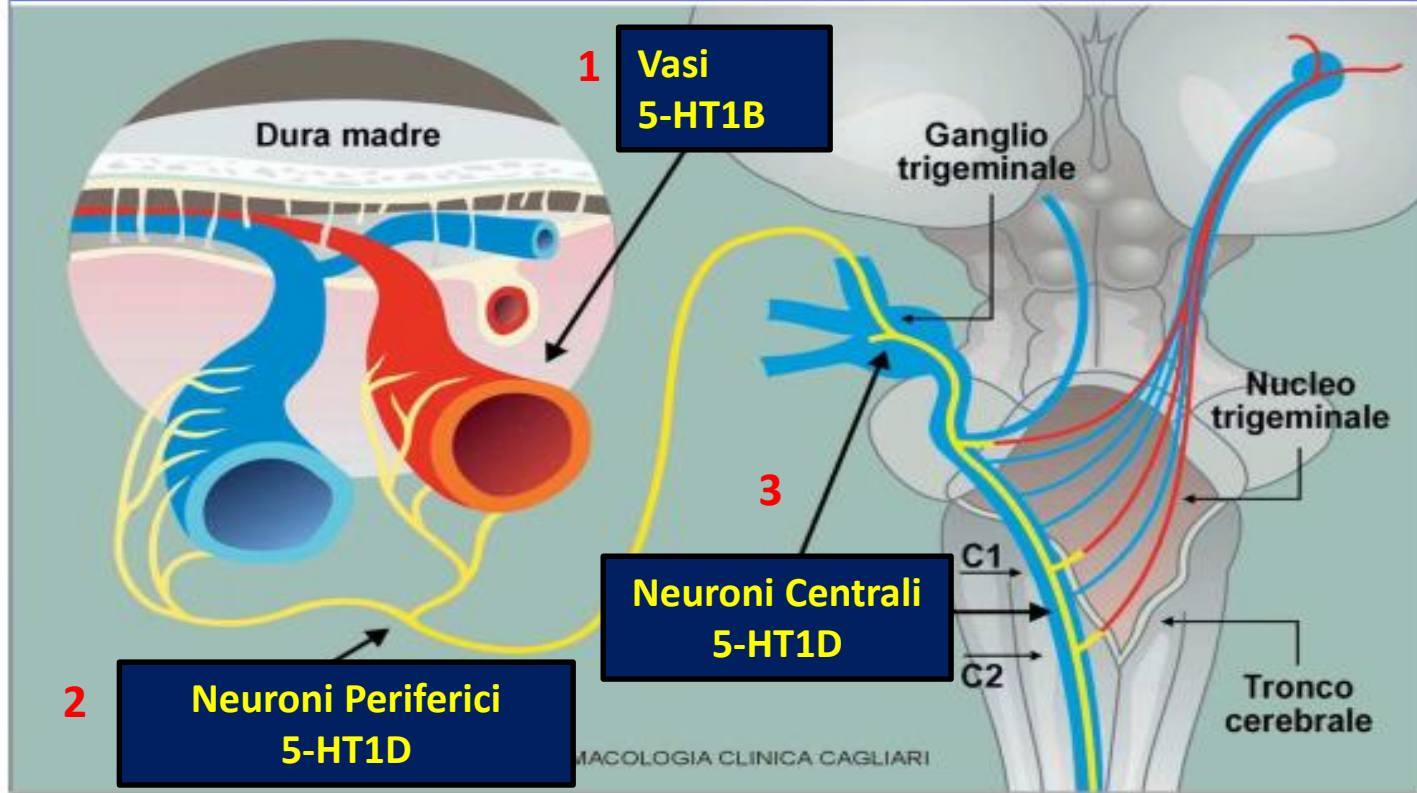
**Agonisti selettivi rec. 5-HT<sub>1B/D</sub>**  
**efficaci nel trattamento delle emicranie**

**x azione a liv delle fibre sensitive del trigemino** favorendo la costrizione dei grandi vasi cranici e Inibendo il rilascio di neuropeptidi infiammatori

**TRIPTANI** (Rizatriptan, Sumatriptan, Zolmitriptan)



# Meccanismo d'azione dei triptani



I triptani esercitano la propria azione attraverso tre principali meccanismi:

1. Vasocostrizione dei distretti cranici, mediata dai recettori serotoninergici 5HT1B
2. Inibizione neuronale periferica, mediata da recettori serotoninergici 5HT1D
3. Inibizione della trasmissione neuronale mediata da neuroni di secondo ordine del sistema trigeminovascolare (mediata da recettori 5HT1D)

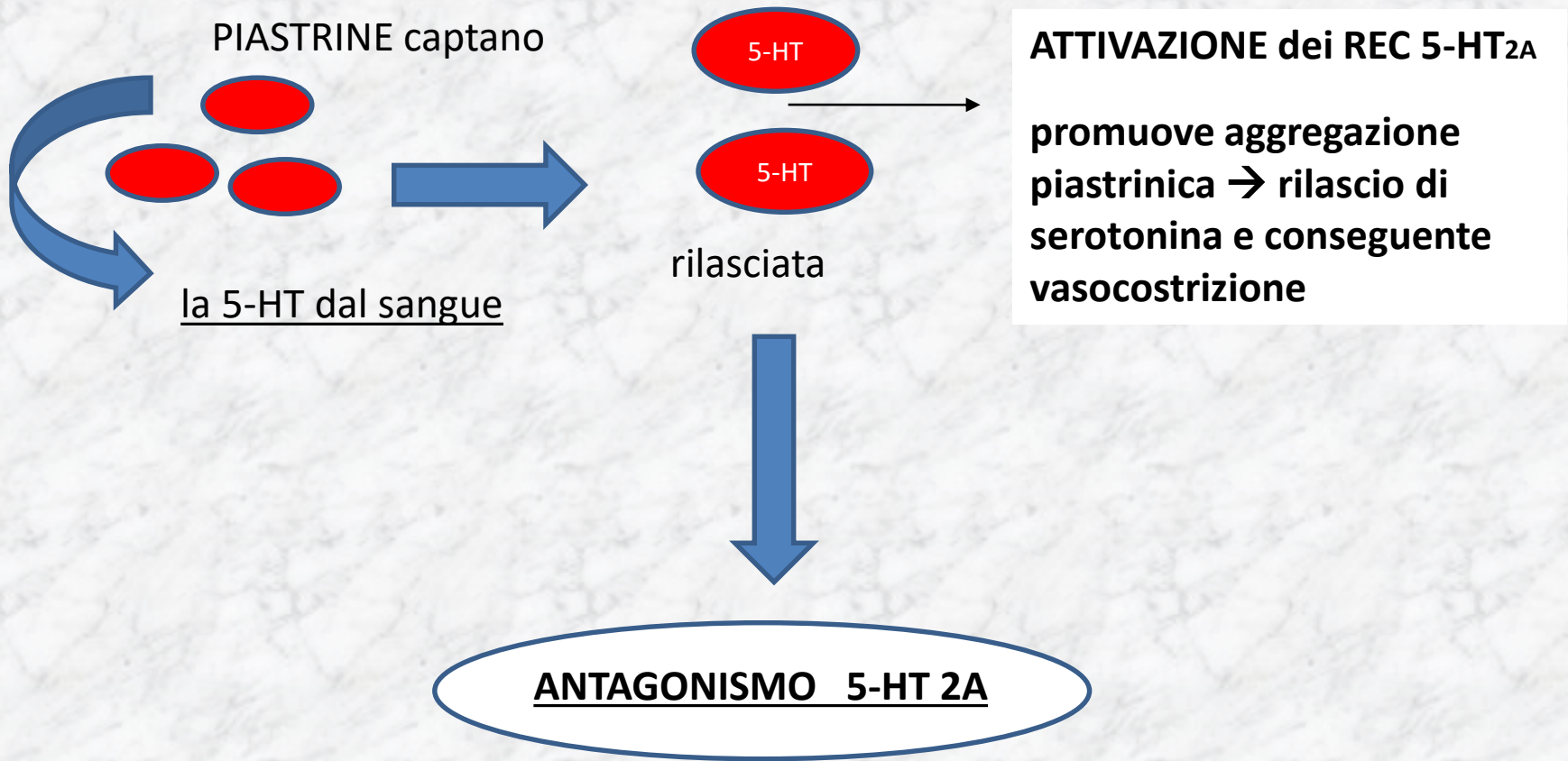
## **Ruolo della 5-HT:**

**→ nella regolazione del tono della muscolatura liscia:**

- sistema cardiovascolare**
- tratto gastrointestinale**

**→ Aumento della aggregazione piastrinica**

# Regolazione del Sistema Cardiovascolare



**Sarpogrelato** (antiaggregante nel trattamento dell'aterosclerosi )

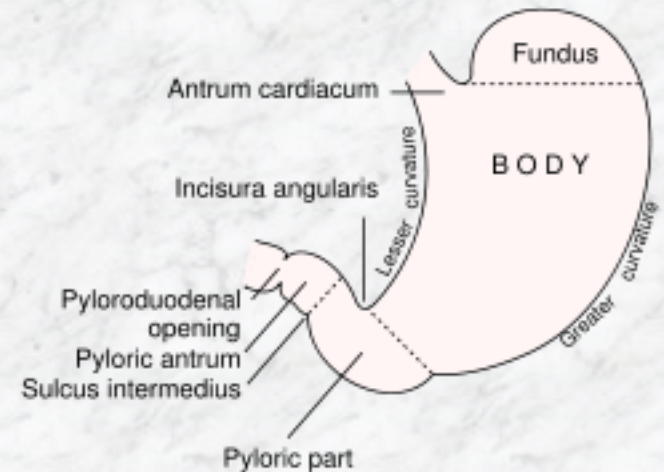
**Ketanserina** (attività anti-ipertensiva, mediata anche da attivazione dei rec 5-HT<sub>1A</sub> →  
causando ipotensione)

# Regolazione del sistema Gastroenterico

## (controllo a vari livelli)

### La serotonina quando lega i rec 5HT<sub>4</sub> a livello dell'intestino **(PROCINETICO)**

- ↑ della motilità intestinale che promuove lo svuotamento gastrico  
**EFF. diretto sulla muscolatura liscia**
- stimola la peristalsi intestinale  
**EFF. indiretto di tipo eccitatorio sui neuroni enterici**
- controlla anche nausea e vomito



**Metoclopramide = Plasil nome commerciale**

**AGONISTI DEL RECETTORE 5-HT<sub>4</sub> (MA ANCHE ANTAG 5HT<sub>3</sub>)**

USATO come farmaco antiemetico → inibisce il riflesso del vomito  
stimolano l'attività peristaltica e lo svuotamento dello stomaco

## • ANTAGONISTI 5-HT<sub>3</sub>

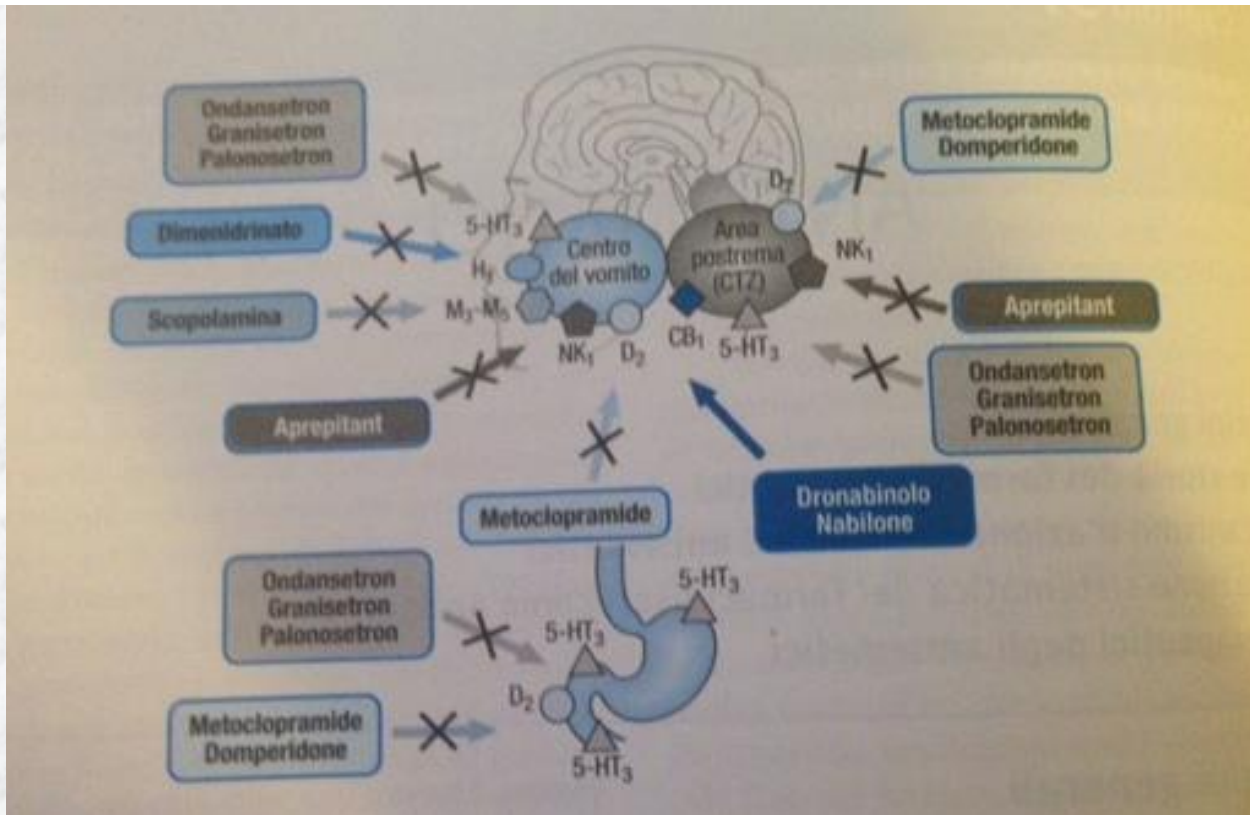
implicati nel riflesso del vomito, espressi nella CTZ (chemoreceptor trigger zone) e anche nell'intestino

### **Setroni (Ondansetron, Granisetron)**

#### **ANTAG. SELETTIVI USATI NEL TRATTAMENTO DEL VOMITO**

indotto da farmaci chemioterapici

Di solito sono somministrati per via endovenosa 30 min prima del trattamento chemioterapico



## IN CORSO DI STUDIO :

**ANTAGONISTI REC. 5-HT6** = per il trattamento dell'Alzheimer

Potrebbero aumentare la trasmissione colinergica  
regolando in maniera positiva

**APPRENDIMENTO e MEMORIA**

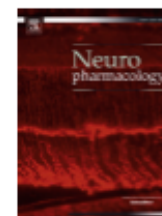
- **ANTAGONISTI REC. 5-HT7** = come potenziali antidepressivi



Contents lists available at ScienceDirect

# Neuropharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/neuropharm](http://www.elsevier.com/locate/neuropharm)



## Review

# Serotonergic pharmacology in animal models: From behavioral disorders to dyskinesia



Maude Beaudoin-Gobert<sup>a,b</sup>, Véronique Sgambato-Faure<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Centre de Neurosciences Cognitives, Centre National de la Recherche Scientifique UMR 5229, Bron cedex F-69675, France

<sup>b</sup>Université Lyon 1, France

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 23 November 2013

Received in revised form

19 January 2014

Accepted 20 January 2014

### Keywords:

Dyskinesia

Depression

Anxiety

Aggressiveness

Anorexia

Serotonin

## ABSTRACT

Serotonin (5-HT) dysfunction has been involved in both movement and behavioral disorders. Serotonin pharmacology improves dyskinetic movements as well as depressive, anxious, aggressive and anorexic symptoms. Animal models have been useful to investigate more precisely to what extent 5-HT is involved and whether drugs targeting the 5-HT system can counteract the symptoms exhibited. We review existing rodent and non-human primate (NHP) animal models in which selective 5-HT or dual 5-HT-norepinephrine (NE) transporter inhibitors, as well as specific 5-HT receptors agonists and antagonists, monoamine oxidase A inhibitors (MAO-A) and MDMA (Ecstasy) have been used. We review overlaps between the various drug classes involved. We confront behavioral paradigms and treatment regimen. Some but not all animal models and associated pharmacological treatments have been extensively studied in the literature. In particular, the impact of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI) has been extensively investigated using a variety of pharmacological or genetic rodent models of depression, anxiety, aggressiveness. But the validity of these rodent models is questioned. On the contrary, few studies did address the potential impact of targeting the 5-HT system on NHP models of behavioral disorders, despite the fact that those models may match more closely to human pathologies. Further investigations with careful behavioral analysis will improve our understanding of neural bases underlying the pathophysiology of movement and behavioral disorders.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

differentially with several other neuronal systems. Reducing the levels of extracellular 5-HT can mainly be observed following an increase in its uptake by SERT or catabolism into its main metabolite the 5-hydroxyindolacetic acid (5-HIAA) following an oxidation using the monoamine oxidase A (MAO-A) (Sjoerdsma et al., 1955) (Fig. 1).

Levels of 5-HT in the brain can be modulated by several means. A frequently used approach is to lower the levels of 5-HT by reducing tryptophan contributions. It results in rapid and transient decreases in the synthesis and release of 5-HT (Fadda, 2000). An additional approach consists to inhibit the synthesis of 5-HT following a systemic, intraperitoneal (i.p.) or intra-cerebral injection of parachlorophenylalanine (pCPA), an inhibitor of the tryptophan hydroxylase activity, however at specific doses (Jéquier et al., 1967). Finally, in animals, the levels of 5-HT decrease following local injection of the neurotoxin 5,7-hydroxytryptamine (5,7-DHT) (Caillé et al., 2002; Fuxe et al., 1978; Man et al., 2009) or chronic administration of MDMA (3,4-methylenedioxyamphetamine or Ecstasy) (Hatzidimitriou et al., 1999; Sgambato-Faure et al., 2012; Stone et al., 1988). On the other side, the levels of extracellular 5-HT increase following administration of different substances such as SSRIs (Moret and Briley, 1996), dual 5-HT-norepinephrine (NE) uptake inhibitors (SNRIs), MAO-A inhibitors and specific agonists and antagonists of the 5-HT receptors (Fig. 1). This review summarizes and compares the impact of 5-HT modulators on animal models of behavioral disorder such as depression, anxiety, aggressiveness and anorexia as well as L-DOPA-induced dyskinesia (LID).

## 2. Animal models of depression

### 2.1. Selective serotonin reuptake inhibitors

Citalopram (Fig. 1), one of the first SSRIs introduced in the market, is used by clinicians for routine depression care (Cipriani et al., 2009, 2012). The effects of citalopram have been reported in several studies (Table 2) using rodent in behavioral assays (Table 3) such as the tail suspension test (TST) and the forced swim test (FST), in which immobility is interpreted as an expression of behavioral despair or entrapment (Cryan et al., 2005; Lucki et al., 2001). In the TST, acute administration of citalopram dose-dependently reduced immobility of several mouse lines (Crowley et al., 2005). In the FST, chronic administration of fluoxetine (Prozac®), another SSRI, reversed the depressive-like behavior by

decreasing immobility and increasing escape attempts of wild-type (WT) rats (Chau et al., 2011). Similar effects were observed following fluoxetine, directly infused within the raphe nuclei of mice (Baudry et al., 2010). Recently, increases in the expression of a particular micro-RNA, named miR-16, has been detected following infusion of fluoxetine in the raphe nuclei, mimicking antidepressive-like behavior (Baudry et al., 2010). Alike, chronic administration of paroxetine in rats with tryptophan depleted levels reduced depression-like behavior (Franklin et al., 2012). Interestingly, deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in naïve or dopamine-depleted rats decreased the firing rate of serotonergic neurons in DRN and enhanced immobility in the FST, which is counteracted by chronic administration of citalopram (Temel et al., 2007). In the Skinner box paradigm, chronic administration of citalopram decreased the number of entries and the time spent in the withdrawal compartment in order to avoid the operant conditioning chamber, therefore attenuating avoidance, a symptom of depression (Huston et al., 2012).

The effects of SSRIs (Table 2) have also been analyzed in genetic rodent models of depressive-like behaviors such as in mice lacking either the 5-HT<sub>1B</sub> receptor (Gardier et al., 2001), p11 (Svenningsson, 2006) or CREB-Regulated Transcription Coactivator 1 (CRTCI) (Breuillaud et al., 2012) and Flinders Sensitive Line (FSL) rats (Melas et al., 2011; Mikrouli et al., 2011). The acute administration of citalopram or paroxetine, another SSRI, failed to decrease the immobility in the FST of the 5-HT<sub>1B</sub> knock out (KO) compared to WT mice, suggesting that antidepressant effects of SSRI depend on activation of the 5-HT<sub>1B</sub> receptor (Gardier et al., 2001). The p11 KO mouse exhibits a depressive-like phenotype and displays reduced behavioral reactions to antidepressants (Svenningsson, 2006). P11 (also called S100A10) belongs to the family of S100 proteins. P11 interacts with the 5-HT<sub>1B</sub> (Svenningsson, 2006) and 5-HT<sub>4</sub> receptors (Wamer-Schmidt et al., 2009) in the brain (Egeland et al., 2011) and favors their localization in the plasma membrane. The expression of p11 increases in rodent brain following chronic administration of antidepressants, but decreases in rodent animal models of depressive-like behavior (helpless H/Rouen mice) (El Yacoubi et al., 2003; Svenningsson, 2006), and in brain tissue from human with depression. Of note the local and targeted down-regulation of p11 in the nucleus accumbens of normal mice is sufficient to induce a depressive-like behavior similar to the one exhibited by p11 KO mice (Alexander et al., 2010), in agreement with possible involvement of this nucleus in emotional states (Barrot et al., 2002). Finally,



# STUDI COMPORTAMENTI PER VALUTARE LA DEPRESSIONE

**Tail suspension test (TST)** = test comportamentale utile per lo screening di potenziali farmaci antidepressivi e per la valutazione di comportamenti correlati alla depressione.

I topi sono sospesi dalle loro code con del nastro adesivo, in una posizione tale da non poter uscire o aggrapparsi alle superfici vicine. Durante questo test, in genere di **sei minuti di durata**, i comportamenti di fuga vengono quantificati

Soluzione al comportamento di arrampicata in coda, un problema comune che rende questo test inutilizzabile in alcuni ceppi di topi  
→ Si previene passando le code del mouse attraverso un piccolo cilindro di plastica prima della sospensione.

Utilizzo di due cronometri separati.

Il primo cronometro conta alla rovescia da 360 secondi e avvisa l'osservatore quando termina il periodo di analisi comportamentale. Il secondo cronometro, controllato dall'osservatore, misura il tempo trascorso in mobilità.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3353516/>

## Forced swim test (FST)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3353513/>

Usato per la valutazione dei farmaci antidepressivi, di vecchi e nuovi composti e manipolazioni sperimentali che mirano ad indurre o prevenire stati depressivi.

I topi sono collocati in un serbatoio trasparente (da cui non può scappare) che viene riempito con acqua e viene misurato il loro comportamento di mobilità relativo alla fuga.

il volume dell'acqua nel cilindro deve essere uguale per i diversi topi impiegati nell'esperimento.

Le dimensioni dei serbatoi devono essere selezionate in modo che i topi non possano toccare il fondo del serbatoio, né con le zampe né con la coda.

L'altezza del serbatoio dovrebbe essere abbastanza alta da impedire ai topi di fuggire

**Le sessioni in genere durano sei minuti.** Tuttavia, vengono analizzati solo gli ultimi quattro minuti del test. Ciò è dovuto al fatto che molti topi sono molto attivi all'inizio del FST e che i potenziali effetti del trattamento possono essere oscurati durante i primi due minuti.

Viene misurato il tempo trascorso da ogni mouse in movimento. La quantità totale di tempo di mobilità viene quindi sottratta dai 240 secondi del tempo di test e viene quindi indicata come tempo di immobilità.

# STUDI COMPORTAMENTI PER VALUTARE L'ANSIA

## Animal models of ANXIETY

Si possono ottenere manipolando geneticamente l'espressione dei recettori 5HT (es. 5HT-1°)

La paura viene misurata registrando il tempo impiegato per lasciare IL braccio aperto.

## ELEVATED T-MAZE

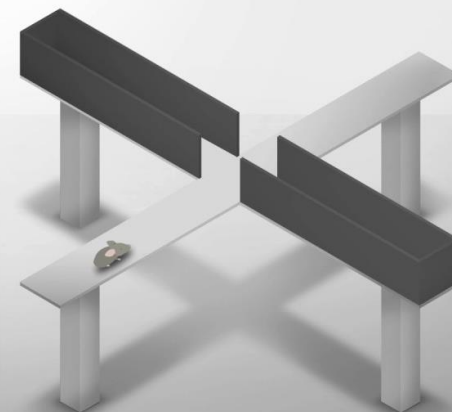


## Maze Basics: Elevated Plus Maze



General Timer

Arms	Total No of Entries	Total Time Spent
Open Arm	1	
Close Arm		



## 5. Animal models of anorexia

### 5.1. Selective serotonin reuptake inhibitors

Anorexia nervosa (AN) is a mental disorder characterized by a self-imposed food restriction despite an energy request. This disorder is obviously complex dysfunctions of the central nervous system, as they often coexist with other mental diseases, such as pathological anxiety (Godart et al., 2000) and depression (Casper, 1998) including, but not systematically, motor hyperactivity (Casper, 2006; Davis, 1997). Significant advances have been made on its pathophysiology by using animal models. Intraperitoneal lipopolysaccharide (LPS) administration has been proved to induce an anorexia-like behavior in rats as they exhibit a decreased food intake and an increased behavioral hyperactivity (Yirmiya, 1996). Chronic treatment with paroxetine and venlafaxine failed to alter the LPS-driven behavioral response. In contrast, chronic treatment with desipramine prevented LPS-induced anorexia (Shen et al., 1999) (Table 2). The activity-based anorexia phenomenon models aspects of AN in rodent, including progressive weight loss, reduced food intake, and hyperactivity (Routtenberg and Kuznesof, 1967). Chronic fluoxetine treatment suppressed wheel running, enhanced food intake and attenuated weight loss in rat (Altemus et al., 1996) and mice (Klenotich et al., 2012).

Evidence from human studies suggests that the SERT is important in regulating feeding behaviors. Administration of SSRIs is used clinically to treat bulimia nervosa (Walsh et al., 2004) and to prevent relapse in anorexia nervosa (Kaye et al., 2001). However minimal or no effect of SSRI medication has been evidenced in adolescent suffering from AN (Holtkamp et al., 2005). Patients with anorexia exhibit an increased 5-HT<sub>1A</sub> binding (notably in the prefrontal cortex and dorsal raphe nucleus) (Bailer et al., 2007), which can reduce the firing rate of 5-HT neurons and decrease extracellular 5-HT (Nichols and Nichols, 2008). This upregulation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors may be a compensatory mechanism as 5-HT inhibits food intake. Thus, mice models exhibiting a decreased extracellular 5-HT rate have been developed such as mice overexpressing SERT. Surprisingly, food intake and satiety are not impaired by SERT over-expression in mice (Pringle et al., 2008), which suggest that adaptive mechanisms install progressively to circumvent the absence of SERT to modulate satiety.

# Animal models of eating disorders

Neuroscience 2012 Jun 1; 211: 2–12

## Anorexia Nervosa

- Self-starvation/Activity based anorexia(ABA)
- Stress models
- Diet restriction
- Genetic model

## Bulimia nervosa/Binge Eating

- Food restriction
- Stress

## Obesity

- Genetic model