



Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

(PEDECIBA) – Biología

Subárea Neurociencias

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas



**Establecimiento de un modelo celular para el estudio
de la modulación de las neuronas serotoninérgicas**

Eugenia Saiz

Directora de Tesis: Patricia Lagos

Co-directora: Giselle Prunell

Diciembre 2017. Montevideo, Uruguay.

Índice.

Índice.	2
Resumen.	5
Introducción.	7
Antecedentes generales.	7
1. Serotonina.	7
1.1. Biosíntesis.	7
1.2. Almacenamiento.	8
1.3. Liberación.	9
1.4. Receptores serotoninérgicos.	10
1.5. Recaptación.	13
1.6. Degradación.	13
2. Sistema serotoninérgico.	14
2.1. Ontogenia del sistema serotoninérgico.	14
2.2. Localización del sistema serotoninérgico en ratas adultas.	15
2.3. Rol de los receptores 5-HT 1 en el control de la excitabilidad de las neuronas serotoninérgicas.	16
2.4. Modulación farmacológica del sistema serotoninérgico.	19
2.5. Sistema serotoninérgico y depresión.	19
3. Sistemas de neuropéptidos.	20
3.1. Hormona concentradora de melanina (MCH).	21
3.2. Biosíntesis.	22
3.3. Almacenamiento.	22
3.4. Liberación.	23
3.5. Actividad sináptica.	24
3.6. Internalización y desensibilización del receptor.	24
Antecedentes particulares.	25
1. Relación entre el sistema serotoninérgico y el Sistema MCHérgico.	25
2. Cultivo primario como herramienta para el estudio in vitro de la fisiología de sistemas de neurotransmisión.	27
2.1. Cultivo primario de neuronas romboencefálicas.	27
3. Métodos de cuantificación de los niveles de serotonina.	29
Hipótesis.	31
Objetivo general.	31
Objetivos específicos.	31
Metodología.	32
1. Identificación de neuronas serotoninérgicas (5HT y SERT) y fibras MCHérgicas en cortes sagitales de embriones de rata en E14.	32
1.1. Cortes a congelación.	32

1.2. Inmunohistoquímica.....	32
2. Caracterización morfológica del cultivo primario de romboencéfalo.....	33
2.1. Cultivo primario de romboencéfalo.....	33
2.2. Detección de los diferentes fenotipos celulares en cultivo por inmunofluorescencia.....	35
2.3. Análisis de los ensayos de inmunofluorescencia.....	35
3. Caracterización funcional del cultivo primario de romboencéfalo.....	37
3a. Cuantificación de niveles celulares y extracelulares de serotonina y 5-HIAA por HPLC-ED.....	37
3b. Modulación de las neuronas serotoninérgicas en cultivo mediante diferentes tratamientos farmacológicos.....	38
4. Cuantificación de los niveles de serotonina y 5-HIAA luego del tratamiento agudo con MCH.....	39
Resultados.....	41
1. Identificación de neuronas serotoninérgicas y fibras MCHérgicas en cortes sagitales de embriones de rata en E14.....	41
2. Caracterización fenotípica del cultivo primario de romboencéfalo.....	41
2.1. Neuronas serotoninérgicas.....	41
2.2. Otros fenotipos celulares.....	43
3. Caracterización funcional del cultivo primario de romboencéfalo.....	46
3a. Cuantificación de los niveles de serotonina y 5-HIAA.....	46
3a.1. Niveles basales extracelulares y celulares de serotonina y 5HIAA.....	46
3b. Modulación de las neuronas serotoninérgicas mediante diferentes tratamientos farmacológicos.....	46
3b.1. Efecto del KCl y EGTA en los niveles extracelulares de serotonina y 5HIAA.....	46
3b.2. Efecto del citalopram en los niveles extracelulares y celulares de serotonina y 5HIAA.....	47
3b.3. Efecto de Nortriptilina en los niveles extracelulares de serotonina y 5HIAA.....	48
3.4.b. Efecto de clorgilina sobre los niveles extracelulares de serotonina y 5HIAA.....	49
3.5.b. Efecto de 8-OH-DPAT sobre los niveles extracelulares de serotonina y 5HIAA.....	50
3.6.b. Efecto de WAY 10035 sobre los niveles extracelulares de serotonina y 5HIAA.....	50
4. Cuantificación de los niveles de serotonina y 5-HIAA luego del tratamiento agudo con MCH.....	51
Discusión.....	52
1. Identificación de neuronas serotoninérgicas y fibras MCHérgicas en embriones de rata en E14.....	52
2. Caracterización fenotípica del cultivo primario de romboencéfalo.....	53
2.1. Neuronas serotoninérgicas.....	53
2.2. Otros fenotipos celulares.....	53
3. Caracterización funcional del cultivo primario de romboencéfalo.....	56
3a. Cuantificación de los niveles basales extracelulares y celulares de serotonina y 5-HIAA.....	56
.....	56
3b. Modulación de las neuronas serotoninérgicas en cultivo mediante diferentes tratamientos farmacológicos.....	57
.....	57
3b.1. Efecto de KCl en los niveles extracelulares de serotonina y 5HIAA.....	57
3b.2. Efecto de EGTA sobre los niveles extracelulares de serotonina y 5-HIAA.....	57
3b.3. Efecto del citalopram en los niveles extracelulares y celulares de serotonina y 5HIAA.....	58
3b.4. Efecto de Nortriptilina en los niveles extracelulares de serotonina y 5HIAA.....	58
3b.5. Efecto de clorgilina sobre los niveles extracelulares de serotonina y 5HIAA.....	59
3b.6. Efecto de 8-OH-DPAT sobre los niveles extracelulares de serotonina y 5HIAA.....	59

3b.7. Efecto de WAY 10035 sobre los niveles extracelulares de serotonina y 5HIAA.....	60
4.Efecto de la MCH sobre los niveles extracelulares de serotonina y 5HIAA.....	60
Conclusiones y perspectivas.....	63
Referencias bibliográficas.....	64

Resumen.

Diversas evidencias apuntan a una importante participación del sistema serotoninérgico en la fisiopatología de la depresión, una de las enfermedades psiquiátricas más prevalentes de la población mundial. En la actualidad, el sistema serotoninérgico es el blanco terapéutico de la mayoría de las drogas antidepresivas. Sin embargo, el retraso significativo entre el inicio del tratamiento y la aparición del efecto terapéutico deseado, y su inefectividad en un alto porcentaje de casos, plantea la necesidad de profundizar en el estudio de la interacción del sistema serotoninérgico con otros sistemas de neurotransmisores o neuromoduladores endógenos, que refuercen los efectos terapéuticos de los antidepresivos serotoninérgicos clásicos.

El neuropéptido hormona concentradora de melanina (MCH, de sus siglas en inglés: melanin-concentrating hormone), neuromodulador endógeno del sistema serotoninérgico, se eligió para el estudio de la modulación de las neuronas serotoninérgicas aisladas. Para ello, primero se realizó la optimización del protocolo de un cultivo primario de romboencéfalo de rata en la etapa embrionaria 14 (E14) y ensayos de inmunohistoquímica para la localización de las fibras MCHérgicas y neuronas serotoninérgicas en cortes sagitales de embriones de rata en E14. Posteriormente, el cultivo primario fue caracterizado fenotípicamente mediante técnicas de inmunofluorescencia, y funcionalmente a través de la cuantificación de los niveles de serotonina y de su principal metabolito el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) por cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica (HPLC-ED). Se cuantificaron los niveles de serotonina y 5-HIAA basales (control), y la variación de éstos ante diferentes tratamientos: cloruro de potasio (KCl), el quelante de calcio EGTA y drogas que modulan específicamente al sistema serotoninérgico (inhibidores de la recaptación de serotonina –IRSs-, inhibidor de la MAO A y un agonista y antagonista de los receptores 5-HT_{1A}).

Una vez establecido el modelo celular, se estudió la modulación de las neuronas serotoninérgicas por la MCH, mediante la cuantificación de los niveles de serotonina y 5-HIAA luego del tratamiento con dicho neuropéptido.

Nuestros resultados muestran que: 1) los embriones en E14 presentan una gran densidad de fibras MCHérgicas provenientes del hipotálamo lateral, que alcanzan la zona rostral del romboencéfalo, y de neuronas serotoninérgicas en toda la región romboencefálica; 2) el cultivo primario de romboencéfalo a los 14 días in vitro (DIV), posee un $2,2 \pm 0,7\%$ de neuronas serotoninérgicas, $56,7 \pm 7,6\%$ de neuronas

GABAérgicas y no presenta neuronas catecolaminérgicas, ni astrocitos;3) se encuentra funcionalmente activo ya que pudieron ser cuantificados tanto los niveles de serotonina y 5-HIAA endógenos basales como los inducidos farmacológicamente, y 4) que los niveles de serotonina luego del tratamiento con MCH no mostraron variaciones significativas comparados con los niveles controles, aunque pudo observarse una tendencia a su disminución.

Los resultados obtenidos permiten concluir que: 1) el cultivo primario de romboencéfalo presentó un bajo número de neuronas serotoninérgicas, pero que sin embargo, dichas neuronas se encuentran funcionalmente activas y que responden de forma óptima a los diferentes estímulos y drogas específicas del sistema serotoninérgico, y 2) la modulación de las neuronas serotoninérgicas por la MCH no respondió de la forma esperada, por lo que deben realizarse futuros experimentos para modificar las variables en el cultivo que permitan evidenciar dicha modulación.

Introducción.

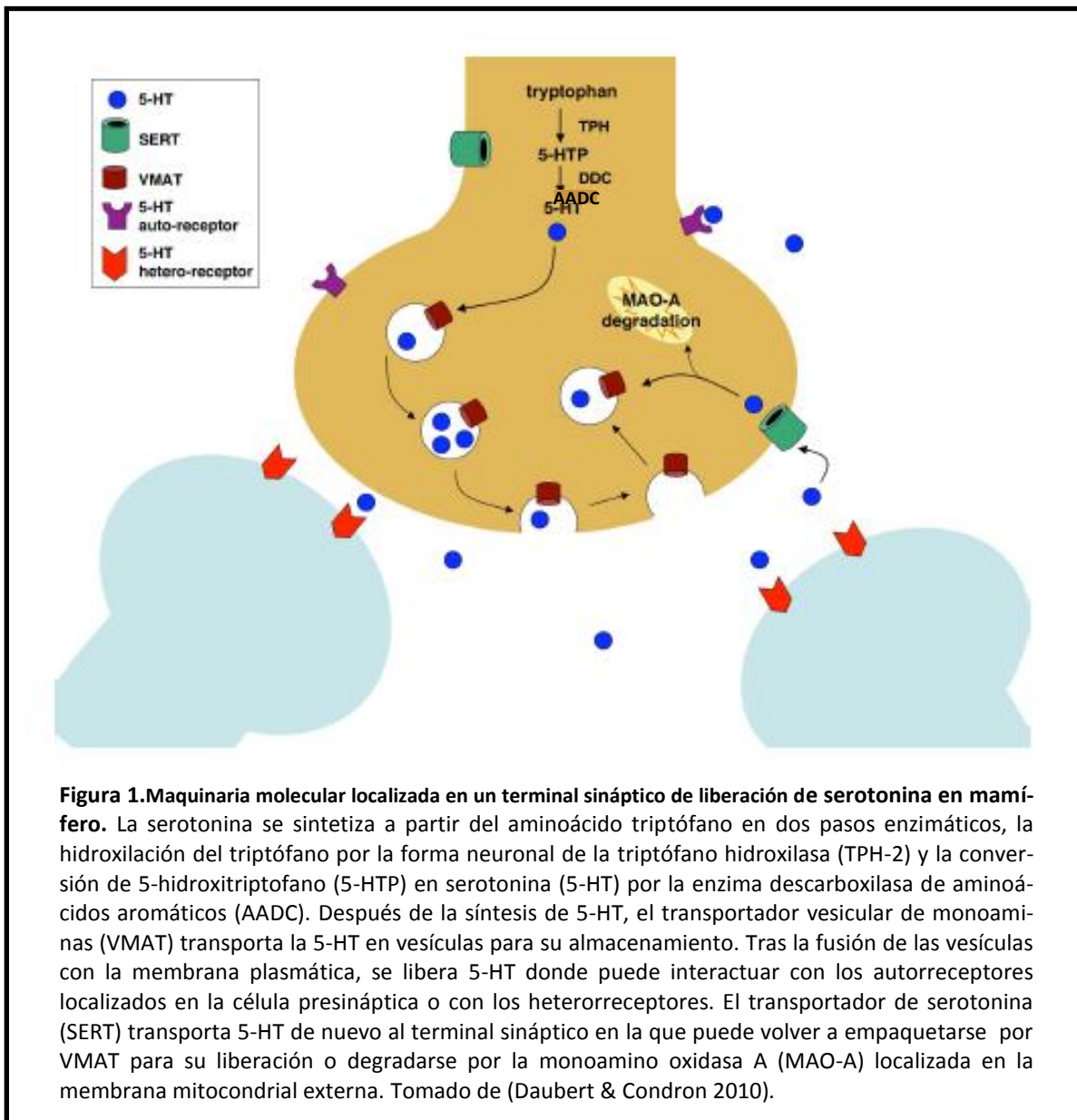
Antecedentes generales.

1. Serotonina.

La serotonina se aisló por primera vez de las células enterocromafines del tracto gastrointestinal y originalmente fue denominada enteramina por Erspamer y Viali en 1937. Más tarde fue identificada y denominada serotonina (Erspamer & Asero 1952). Anteriormente, fue aislada e identificada, por un grupo independiente al de Erspamer; Rapport et al, 1948, la llamaron serotonina y demostraron su presencia en extractos de suero y su acción como vasoconstrictor tónico del suero liberado por las plaquetas durante la coagulación de la sangre (Rapport et al. 1948). Posteriormente se confirmó que la serotonina y la enteramina eran la misma sustancia, y se detectó su presencia en extractos cerebrales (Whitaker-Azmitia 1999). Por lo tanto, la serotonina se identificó en tres sistemas principales del cuerpo: el sistema cardiovascular (en la sangre), el tracto gastrointestinal, y el cerebro, pudiendo actuar de tres modos diferentes, como transmisor, actuando localmente en los botones sinápticos; tras la difusión a distancia de sus sitios de liberación, produciendo efectos parácrinos (transmisión de volumen) y circulando en el torrente sanguíneo, produciendo efectos hormonales (De Miguel & Trueta 2005).

1.1. Biosíntesis.

La serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) es una monoaminabiogénica en cuya síntesis participa la enzima triptofanohidroxilasa (TPH), que es codificada por dos genes distintos: TPH-1 en el tejido periférico y TPH-2 en el SNC (Walther & Bader 2003). En el SNC esta enzima es sintetizada en los cuerpos celulares serotoninérgicos de los núcleos del rafe y se encuentra solamente en las células que sintetizan serotonina, siendo la enzima limitante de su síntesis. El paso inicial en la biosíntesis de la serotonina es el transporte facilitado del aminoácido L-triptófano desde la sangre al cerebro. La fuente primaria de triptófano es la proteína de la dieta. Las neuronas serotoninérgicas que contienen la enzima TPH, convierten el triptófano en 5-hidroxitriptofano. La serotonina se sintetiza a partir del 5-hidroxitriptofano por la enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC) (figura 1) (Lovenberg et al. 1962); esta enzima no es exclusiva de neuronas serotoninérgicas y también se encuentra en neuronas dopaminérgicas, donde transforma L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) en dopamina (Lovenberg et al. 1962).



1.2. Almacenamiento.

La serotonina, luego de ser sintetizada en el citosol de la célula, es almacenada en las vesículas secretoras por el transportador vesicular de monoaminas (VMAT) (figura 1), que se encuentra en dos formas diferentes, VMAT1 y VMAT2. VMAT2 es la isoforma dominante en el cerebro, mientras que VMAT1 se expresa esencialmente en los ganglios simpáticos periféricos (Erickson et al. 1996). VMAT utiliza el gradiente electroquímico generado por la enzima H^+ -ATPasa para incorporar la serotonina a las vesículas sinápticas (Anne & Gasnier 2014).

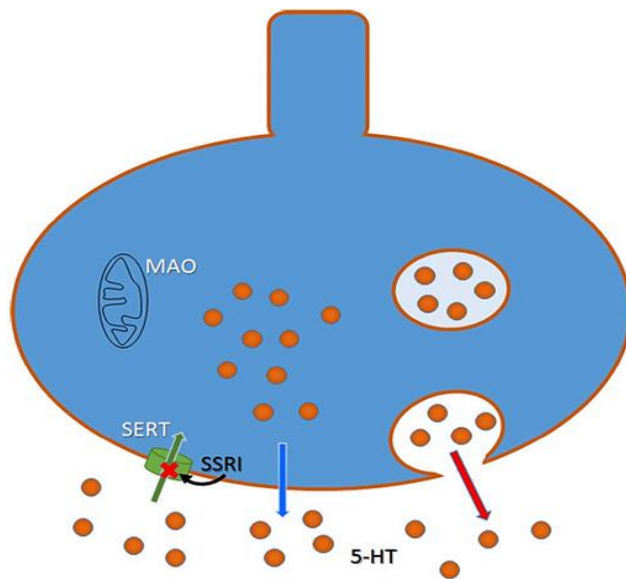


Figura 2. Dibujo esquemático del terminal sináptico de una neurona serotoninérgica. Se muestra la liberación excitotóxica desde las vesículas (flechas rojas) y la liberación no-excitotóxica (flecha azul). La captación a través del transportador de serotonina (SERT) se representa con una flecha

Las terminales presinápticas almacenan serotonina en vesículas claras y, en algunos casos, en vesículas grandes de núcleo denso (Van Bockstaele et al. 1994). Las vesículas de núcleo denso pueden contener además, neuropéptidos como la sustancia P u otros neuropéptidos (Dey & Hoffpauir 1986). Además de la serotonina almacenada en los terminales axonales y sus colaterales (Liposits et al. 1985; Chazal & Ralston 1987), los somas, dendritas y varicosidades axonales de estas neuronas almacenan serotonina en vesículas no sinápticas (Loizou 1972; Héry & Ternaux 1981).

1.3. Liberación.

La liberación de serotonina puede ocurrir desde los terminales sinápticos, actuando localmente en circuitos densamente "cableados" y desde sitios de liberación extrasinápticos axonales y somato-dendríticos en ausencia de dianas postsinápticas, produciendo efectos parácrinos (Sakurai & Katz 2003; Baraban & Aghajanian 1981). La proporción de sitios de liberación sináptica y extrasináptica de las neuronas serotoninérgicas varía en las diferentes zonas del sistema nervioso. Por ejemplo, en la sustancia nigrapars compacta y en el núcleo dorsal del rafe (NDR), coexisten sitios de liberación sináptica y no sináptica (Moukhles et al. 1997).

De forma similar a la liberación sináptica, la liberación somatodendrítica está mediada por la exocitosis de vesículas inducida por calcio (de Kock et al. 2006). Así mismo, en los núcleos del rafe, Mlinar et al. 2015, demostraron la presencia de un flujo no-exocitótico de serotonina a través de la membrana plasmática (figura 2), y sugirieron que las neuronas serotoninérgicas de los núcleos del rafe liberarían serotonina del pool citoplasmático por difusión simple a través de la membrana celular. Como todos los neurotransmisores monoaminérgicos tienen un alto gradiente transmembrana establecido por sus respectivos transportadores de membrana de alta afinidad, en dicho trabajo plantean que la difusión simple de los neurotransmisores monoaminérgicos puede ser un componente significativo de su liberación (Mlinar et al. 2015).

1.4. Receptores serotoninérgicos.

Tras su liberación del terminal sináptico, la serotonina difunde a la hendidura sináptica y ejerce sus efectos a través de una gran diversidad de receptores sinápticos y extrasinápticos (D'Souza & Craig 2010). Los receptores serotoninérgicos son del tipo ionotrópico y metabotrópico. Los de tipo ionotrópico pertenecen a una única familia: 5-HT₃ y son canales iónicos permeables al Na⁺, Ca²⁺⁺ y K⁺ (Barnes & Sharp 1999). Los receptores metabotrópicos son del tipo de receptores acoplados a proteínas G, presentan siete dominios transmembrana, y se pueden clasificar en cuatro grupos de acuerdo al sistema principal de segundo mensajero: los receptores 5-HT₁ acoplados a proteínas G_{ai}/G_{ao} (subtipos 5-HT_{1A}, 5-T_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F}); los receptores 5-HT₂ acoplados a proteínas G_{αq} (subtipos 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}); los 5-HT₄, 5-HT₆ y 5-HT₇ son receptores acoplados a proteínas G_s; y los receptores 5-HT₅ (subtipos 5-HT_{5A} y 5-HT_{5B}) para los que el acoplamiento a proteínas G es todavía incierto. Aunque cada tipo de receptor puede ser potencialmente activado por serotonina, presentan diferencias en su distribución neuroanatómica y en las afinidades por la serotonina, agonistas y antagonistas (Bockaert et al. 2006).

En la tabla 1 se presentan los receptores de serotonina y cada subtipo. Para cada subtipo, la tabla indica las características farmacológicas, la localización, el mecanismo de acción intracelular y el efecto final sobre la excitabilidad neuronal, la función fisiológica en la que está implicado el receptor y las patologías derivadas de su mal funcionamiento (tabla 1). Más adelante profundizaremos acerca del rol de los subtipos de receptores 5-HT₁, por ser de importancia en el desarrollo de esta tesis.

Los receptores de la familia de tipo 1, ejercen el principal control fisiológico de la actividad de las neuronas serotoninérgicas, pues están presentes como autorreceptores en las propias neuronas serotoninérgicas (Andrade et al. 2015).

Tabla 1. Tipos y subtipos de receptores de serotonina. Para cada subtipo, la tabla indica las características farmacológicas, la localización, el mecanismo de acción intracelular y el efecto final sobre la excitabilidad neuronal, la función fisiológica en la que está implicado el receptor y las patologías derivadas de su mal funcionamiento. Los

Receptor	Localization	Agonists	Antagonists	Intracellular second messenger	Membrane effects	Physiological function	Malfunctioning pathologies
5-HT _{1A}	Dorsal raphe; Hippocampus	8-OH-DPAT buspirone gepirone	NAN 190 MDL 73005EF WAY 100635	G _{i/o} ↑↓ camp ↑ PI turnover*	Hyperpolarization (increase in g _K ; decrease in g _{Ca})	Autoreceptor; modulation of release of other neurotransmitters modulation of anxiety	Anxiety; depression
5-HT _{1B}	Hippocampus; Striatum; Substantia nigra; Raphe nuclei; Cerebellum; Frontal cortex; Cerebral arteries	Sumatriptan	GR55562 SB 216641 SB 272183	-	-	Nerve terminal autoreceptor; modulation of release of other neurotransmitters	migraine
5-HT _{1D}	Dorsal raphe; Human heart	Sumatriptan PNU 109291	BRL 15572	-	-	autoreceptor	migraine
5-HT _{2A}	Cortex; Basal ganglia; Peripheral tissues	DOI DOB	Ketanserin MDL 100907 Cinanserin Mianserin Methysergide	Gq/11 ↑ PI turnover	Depolarization (decrease in g _K)	Possible role in learning and memory	Psychiatric disorders
5-HT _{2B}	Cerebellum; lateral septum; hypothalamus; amigdala; cardiac valves	BW 723C86	SB 200646 SB 204741	Gq/11 ↑ PI turnover	-	Food intake; behaviour	Anxiety; feeding disorders; cardiac valvulopathies
5-HT _{2C}	Choroid plexus ; Hippocampus Habenula Substantia nigra Raphe nuclei	Ro 600175	Mianserin Methysergide Mesulergine	Gq/11 ↑ PI turnover	Depolarization or hyperpolarization in distinct neurons	Food intake; neuroendocrine regulation	Feeding disorders; Cognitive impairment
5-HT ₃	Olfactory bulb Cerebral cortex Hippocampus Amygdala Hypothalamus Solitary tract nucleus	2-methyl-5-HT SR 57227	ICS 205930 Zacopride Ondansetron Granisetron Tropisetron	None: direct gating of channel	Fast depolarization (increase in g _{Na} and g _K)	Pre-synaptic modulation of transmitter release	Anxiety; Schizophrenia; Cognitive impairment
5-HT ₄	Colliculi Hippocampus Peripheral tissues	Renzapride BIMU 8 RS 67506 ML 10302	GR 113808 SB 204070	Gs ↑ cAMP	Slow depolarization (decrease in g _K)	Modulation of transmitter release; memory enhancement	Neurodegenera- tive diseases; Cardiac arrhythmia
5-HT ₆	Striatum Amygdala N. accumbens Hippocampus Cortex Olfactory tubercle		Ro 630563 SB 271046 SB 357134	Gs ↑ cAMP	-	Modulation of acetylcholine transmission	Cognitive dysfunctions (Alzheimer)
5-HT ₇	Cerebral cortex; Thalamic nuclei; hypothalamus; limbic structures	8-OH-DPAT	SB 258719 SB 269970	Gs ↑ cAMP	Slow depolarization (increase of I _h)	Control of circadian rhythms; Thermoregulation Mood and behaviour	Affective disorders; Migraine; Nociception

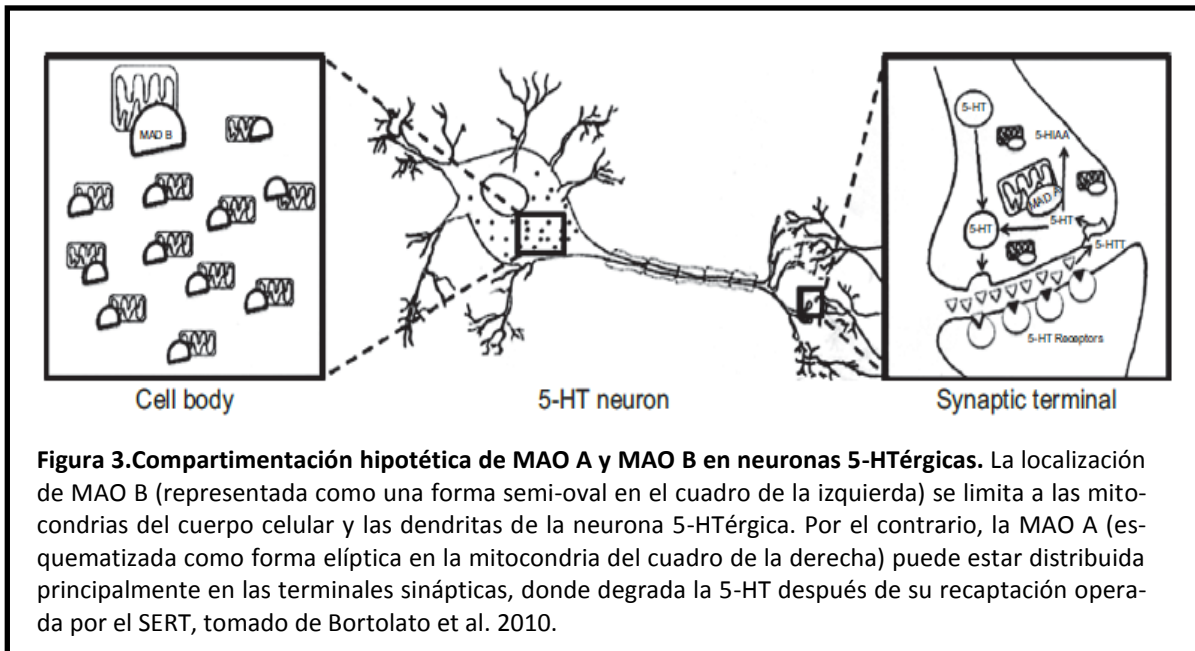
1.5. Recaptación.

Luego de producir sus efectos sobre los receptores, la serotonina extracelular es recaptada por el transportador de serotonina (SERT). La serotonina recaptada puede ser entonces degradada por la enzima monoaminoxidasa A (MAO A) o reciclada a través de su acumulación en vesículas presinápticas, donde vuelve a estar disponible para su liberación (Zahniser & Doolen 2001).

1.6. Degradación.

La degradación de la serotonina es catalizada por la enzima MAO, una flavoproteína integral de las membranas mitocondriales externas de neuronas, glías y otras células. MAO cataliza la desaminación oxidativa de la serotonina mediante su conversión en 5-hidroxi-indolacetaldehído (5-HIAL) (Bortolato et al. 2010), que se procesa adicionalmente en el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) por la enzima aldehído dehidrogenasa NAD⁺-dependiente (ALDH), el cual difunde libremente hacia el medio extracelular. Posteriormente, se transporta al torrente sanguíneo y se excreta a través de los riñones (Udenfriend et al. 1956).

MAO también cataliza la degradación de otros neurotransmisores monoaminérgicos tales como la noradrenalina y dopamina, y también trazas de aminas. Han sido identificadas dos isoenzimas de la MAO, denominados A y B, las cuales difieren en sus bases genéticas, la regulación transcripcional, la preferencia de sustrato, de inhibidores de afinidad y en su distribución regional. Estudios en el cerebro de rata, mediante inmunohistoquímica e hibridación in situ muestran que MAO A se localiza predominantemente en neuronas catecolaminérgicas, mientras que MAO B es más abundante en neuronas serotoninérgicas y astrocitos (Arai et al. 2002). Aunque MAO A, se localiza predominantemente en neuronas catecolaminérgicas, exhibe la más alta preferencia por la serotonina y cataliza su metabolismo en condiciones fisiológicas, y MAO B tiene otros sustratos preferenciales además de la serotonina (Bortolato et al. 2010) (figura 3). Esto ha llevado a la hipótesis de que la MAO B presente en las neuronas serotoninérgicas evita que la célula acumule otros sustratos naturales (por ejemplo, dopamina) que podrían interferir con el almacenamiento, la liberación y recaptación de la serotonina. Diversos estudios han mostrado que el tratamiento agudo tanto local como sistémico con inhibidores de la MAO aumentan las concentraciones extracelulares de serotonina en los núcleos del rafe (Celada & Artigas 1993).

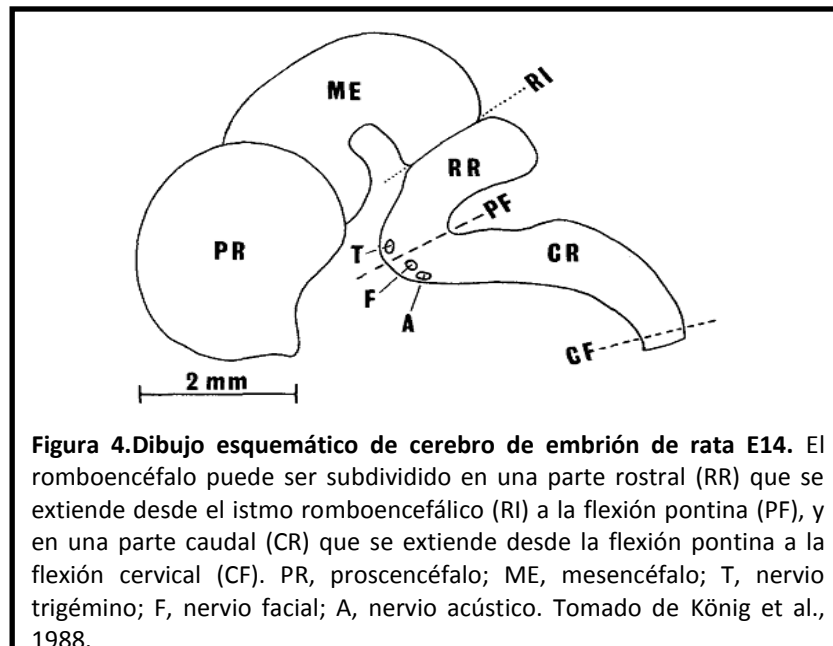


2. Sistema serotoninérgico.

2.1. Ontogenia del sistema serotoninérgico.

Desde el punto de vista embrionario, en ratas, las primeras neuronas serotoninérgicas se detectan en E12, las cuales conforman el grupo rostral del romboencéfalo (Wallace & Lauder 1983). Posteriormente entre E14 y E16 aparece el grupo caudal. Según König et al, 1988, en E14, el grupo caudal está formado por un subgrupo lateral redondeado situado caudalmente al punto más profundo de la flexión pontina y por otro subgrupo bilateral alargado que contiene células y fibras, situado cerca de la línea media en el romboencéfalo caudal (figura 4) (König et al. 1988). Durante el período entre E12 y E19, las neuronas serotoninérgicas continúan aumentando en número y adquieren un árbol dendrítico más complejo mientras migran a su posición permanente (Aitken & Törk 1988).

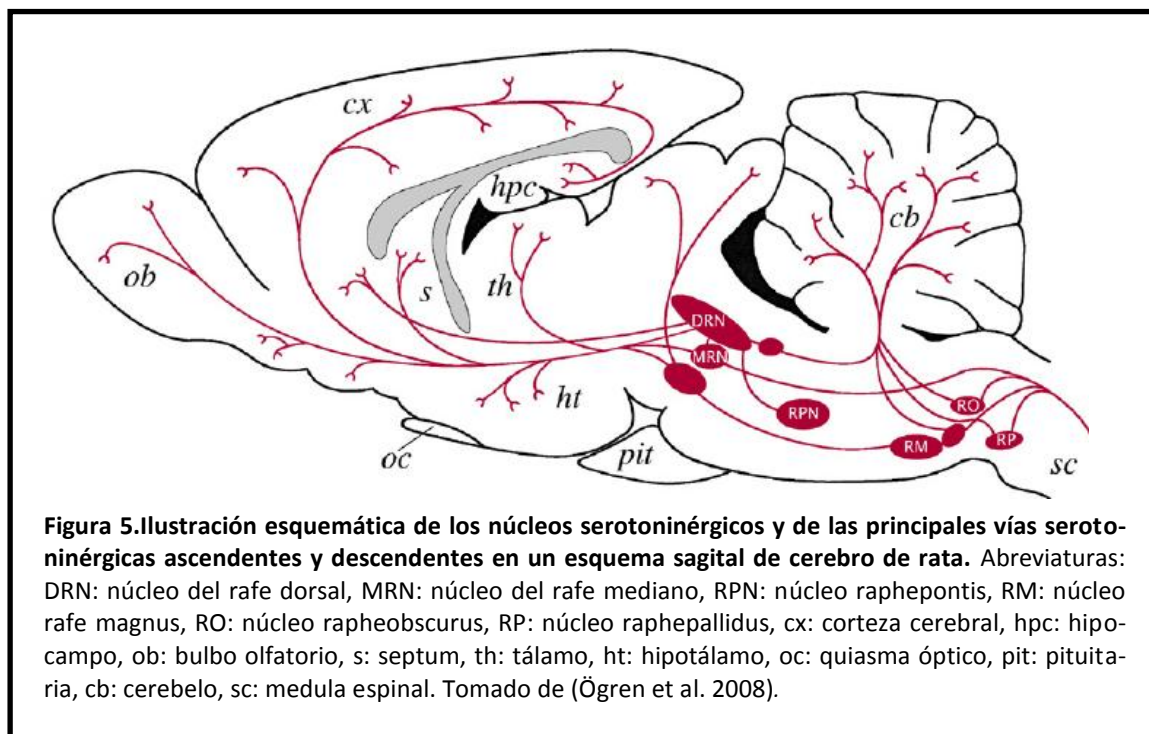
Un gran haz ascendente de fibras surge del grupo rostral, mientras que un haz igualmente grande de fibras descendentes surge del grupo caudal. Según Wallace and Lauder (1983), los axones se observan ingresando en el diencéfalo caudal ya hacia E14, y atraviesan el diencéfalo y el piso del telencéfalo entre E15 y E16 alcanzando el polo neocortical frontal en E17 (Wallace & Lauder 1983).



2.2. Localización del sistema serotoninérgico en ratas adultas.

En las ratas adultas, el sistema serotoninérgico también está conformado por neuronas que contienen serotonina localizadas específica y exclusivamente a lo largo de la línea media del tronco encefálico. Sin embargo sus axones inervan diversas áreas del SNC (figura 5), por lo que se lo denomina un sistema de neurotransmisión difuso. Existen 9 grupos de cuerpos celulares que contienen serotonina, los cuales fueron designados como B1 a B9 (de acuerdo a Dahlstrom y Fuxe, 1964 (Dahlstroem & Fuxe 1964)) y corresponden, la mayoría de ellos, a los núcleos del rafe. Sin embargo, algunos cuerpos celulares se encuentran fuera del rafe, y a su vez, el rafe también contiene neuronas de otros fenotipos neuroquímicos. El grupo más grande de células serotoninérgicas es el grupo B7 contiguo al grupo B6 (más pequeño). B7 y B6, se consideran en conjunto el NDR, localizado a lo largo de la línea media del tronco encefálico. Los grupos B8 y B5 corresponden al núcleo medial del rafe (NMR), mientras que el grupo B9, forma parte del tegmentoventrolateral de la protuberancia y del mesencéfalo, y por tanto, no se considera uno de los núcleos mediales. Los otros núcleos, de B1 a B4, se encuentran situados más caudalmente y contienen un pequeño número de neuronas serotoninérgicas (Dahlstroem & Fuxe 1964).

El NDR contiene el mayor número de neuronas serotoninérgicas del SNC de mamíferos, sin embargo, solamente entre el 40 y 50% del total de los cuerpos celulares de dicho núcleo son serotoninérgicos (Dahlstroem & Fuxe 1964).

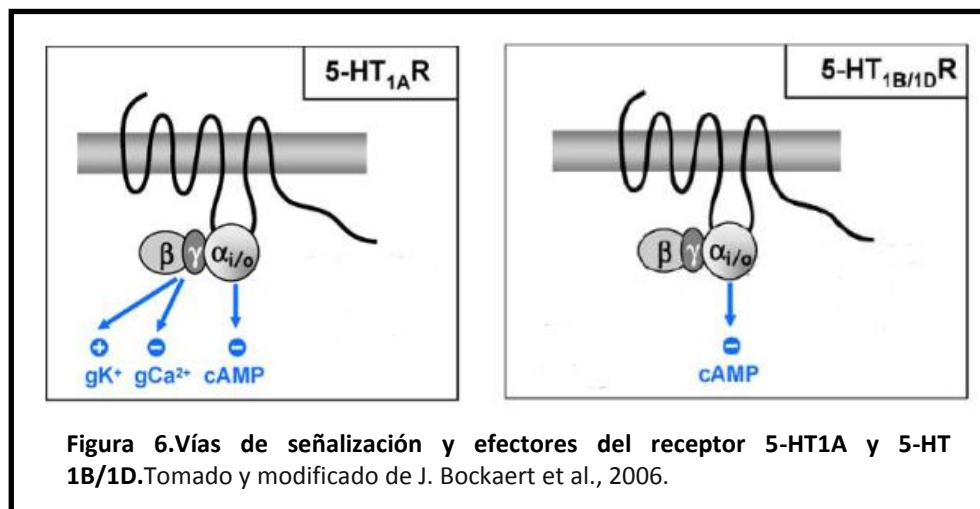


2.3. Rol de los receptores 5-HT₁ en el control de la excitabilidad de las neuronas serotoninérgicas.

Como se mencionó anteriormente, la familia de receptores 5-HT₁ está formada por cinco productos génicos separados: 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} (figura 6), 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} y 5-HT_{1F}. Todos estos receptores se unen a G_{i/o} para inhibir la adenilato ciclasa y reducir los niveles de adenosina monofosfato cíclico (AMPC), pero también se han descrito mecanismos adicionales de transducción de señales (Barnes & Sharp 1999). Aunque su estructura genética y sus propiedades moleculares son similares, existen diferencias celulares importantes y distintos patrones de expresión subcelular, que subyacen a características fisiológicas divergentes. Varios de estos receptores son bien conocidos como autorreceptores que regulan la excitabilidad de las neuronas serotoninérgicas y la liberación de serotonina, aunque también se expresan en neuronas no-serotoninérgicas, donde pueden tener efectos análogos sobre otros neurotransmisores (Barnes & Neumaier 2011).

Los receptores 5-HT_{1A} son uno de los principales subtipo de receptor inhibitorio acoplado a proteínas G_{i/Go} que controlan numerosas cascadas de señalización intracelular, incluyendo la inhibición de la

formación de AMPc, la inactivación de los canales de calcio y la activación de los canales de potasio (Barnes & Sharp 1999). Se encuentran en dos poblaciones principales: en las neuronas serotoninérgicas de los núcleos del rafe (como autorreceptores presinápticos); y en las neuronas postsinápticas principalmente en el hipocampo, septum, amígdala y áreas corticolímbicas (Sanabria-Bohórquez et al. 2002; Pompeiano et al. 1992; Santana et al. 2004).



Varios estudios sugieren que los mecanismos de señalización molecular de los receptores 5-HT_{1A} en los núcleos del rafe son distintos de los de otras regiones cerebrales y pueden estar mediados preferentemente por el acoplamiento a las subunidades de la proteína GG3a que conduce a la inhibición parcial de la adenilil ciclasa (Palego et al. 1999; Valdizán et al. 2010).

La activación serotoninérgica de estos receptores conduce a la apertura de los canales de potasio en la membrana celular y a la hiperpolarización de la célula, lo que resulta en una reducción de la tasa de descarga de dichas neuronas (Sprouse & Aghajanian 1986; Sprouse & Aghajanian 1987). Dado el importante papel de la descarga neuronal en la actividad total del sistema serotoninérgico, la reducción en la tasa de disparo provocada por agonistas de 5-HT_{1A} se traduce inmediatamente en una reducción generalizada de la liberación de serotonina en la mayoría de las áreas cerebrales, pero con un efecto preferencial sobre las regiones inervadas por neuronas presentes en el NDR (Hjorth & Sharp 1991; Adell et al. 1993).

Los autorreceptores 5-HT_{1A} actúan como "válvulas de seguridad" fisiológicas que ayudan a mantener la homeostasis del sistema serotoninérgico. Su activación por la serotonina endógena desempeña un papel fundamental en el control fisiológico de la actividad de las neuronas serotoninérgicas ascendentes. Durante los períodos de vigilia, las neuronas serotoninérgicas muestran una frecuencia de descar-

ga lenta y regular (actividad de marcapasos)(Jacobs & Azmitia 1992).Bajo condiciones de entrada excitatoria excesiva, tales como las producidas por el estrés, se produce un incremento de la liberación de serotonina en la vecindad de los cuerpos celulares que activa los receptores 5-HT1A y ayuda a mantener a la baja y regular el disparo de las neuronas serotoninérgicas(Celada et al. 2001; Adell et al. 1997).

Por otra parte, varios estudios sugieren que esta función reguladora de la actividad de las neuronas serotoninérgicas podría explicar, en gran parte, la acción clínica tardía y lenta de los fármacos antidepresivos (Artigas et al. 1996; Artigas 2001). La administración aguda de antidepresivos (fármacos tricíclicos, inhibidores de la monoaminoxidasa e ISRS) produce un aumento en la serotonina extracelular en los núcleos del rafe (Bel & Artigas 1992; Celada & Artigas 1993), que activa los receptores 5-HT1A y, por tanto, reduce el disparo de las neuronas serotoninérgicas (Blier & de Montigny 1994) y la consiguiente liberación de serotonina (Romero et al. 1996; Artigas et al. 1996). Sin embargo, la activación de los receptores 5-HT1A disminuye con el tratamiento prolongado de estos fármacos. Varias evidencias indican que este efecto es el resultado de la desensibilización inducida por serotonina de los autorreceptores 5-HT1A (Blier & de Montigny 1994; Hervás et al. 2001), fenómeno que explica la aparición de un gran aumento de la serotonina, luego del tratamiento crónico con los fármacos antidepresivos(Bel & Artigas 1993; Ferrer & Artigas 1994; Hervás et al. 2001).

Los autorreceptores 5-HT1B también se distribuyen ampliamente en las neuronas serotoninérgicas y no serotoninérgicas; estos receptores se translocan predominantemente a los terminales axónicos, por lo que existe una discrepancia anatómica entre la localización del ARNm y la proteína del receptor 5-HT1B maduro. Existen evidencias que muestran que los autorreceptores 5-HT1B reducen la síntesis de serotonina y aumentan la recaptación a través del SERT. La activación de los heterorreceptores 5-HT1B por la serotonina inhibe la liberación de una gama de neurotransmisores diferentes, dependiendo de los tipos de neuronas que los expresan, por ejemplo, la regulación de la liberación de GABA por los receptores 5-HT1B se ha encontrado en las proyecciones del putamen y caudado al globus pallidus o substantianigra, del núcleo accumbens al área tegmental ventral y de las neuronas de Purkinje a los núcleos profundos del cerebelo. Así también, el control de la liberación de glutamato por los receptores 5-HT1B se ha encontrado en proyecciones desde el hipocampo al subículo dorsal (Sari 2004).

En suma, los autorreceptores 5-HT1A y 5-HT1B, localizados en diferentes regiones de las neuronas serotoninérgicas, los 5-HT1A en la zona somatodendrítica y los 5-HT1B en axones colaterales recu-

rrentes y en las terminales sinápticas (Robert & Benoit 2008), son importantes controladores del funcionamiento del sistema serotoninérgico en el NDR y sus sitios de liberación.

2.4. Modulación farmacológica del sistema serotoninérgico.

El sistema serotoninérgico es un sistema que puede ser modulado farmacológicamente a través de la interacción de fármacos agonistas y antagonistas de autorreceptores y heterorreceptores específicos; de inhibidores de las enzimas MAO y TPH, y de los transportadores SERT y VMAT. Así, por ejemplo, el agonista del autorreceptor 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT, inhibe la liberación de serotonina tritiada ([³H]-5-HT) inducida por la estimulación celular en rodajas del rafe del mesencéfalo de ratas (Robert & Benoit 2008). Así también, el tratamiento sostenido de cultivos organotípicos de rafe con citalopram, paroxetina y fluoxetina (todos ISRS) provoca un aumento en los niveles extracelulares de serotonina (Nagayasu et al. 2010). La depleción farmacológica de serotonina, mediante la administración de un inhibidor de la TPH, la paraclorofenilalanina (PCPA), bloquea la capacidad de los ISRS para reducir la inmovilidad en el test de suspensión por la cola utilizado como modelo para la identificación de antidepresivos en ratas o ratones (O'Leary et al. 2007).

2.5. Sistema serotoninérgico y depresión.

Un gran número de estudios muestran que el sistema serotoninérgico está involucrado en la regulación de funciones fisiológicas básicas tales como la secreción hormonal, la regulación del ciclo sueño-vigilia, principalmente del sueño REM (rapideyesmovement: movimiento ocular rápido), el control motor, el funcionamiento del sistema inmune, la nocicepción y la ingesta de alimentos. Además, la serotonina participa en las funciones cerebrales superiores, como la cognición y los estados emocionales, mediante la modulación de la plasticidad sináptica, y como ha sido descrito recientemente, de la neurogénesis (Jacobs 2002; Djavadian 2004).

Diversas evidencias apuntan a una importante participación del sistema serotoninérgico en la depresión, una de las enfermedades psiquiátricas más prevalentes de la población mundial, afectando a 350 millones de personas en el mundo, y principal causa mundial de discapacidad (OMS). Un episodio depresivo se caracteriza por un bajo estado de ánimo o la incapacidad de experimentar placer (anhedonia), o ambos, durante más de dos semanas, combinado con varios síntomas cognitivos y vegetativos y la aparición de angustia o deterioro (American Psychiatric Association 2013).

Una disfunción en las neuronas serotoninérgicas del NDR podría estar implicada en la fisiopatología de la depresión (Bach-Mizrachi et al. 2006; Underwood et al. 1999). En este sentido han sido en-

contrados niveles bajos de serotonina y/o de su principal metabolito 5-HIAA en la orina y el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con depresión mayor (Young 1993; Praag 1977). Por otra parte, existen evidencias de que pacientes depresivo-suicidas muestran diferencias significativas en marcadores serotoninérgicos dentro del NDR en comparación con individuos control (Asberg et al. 1976).

El sistema serotoninérgico es el blanco terapéutico de la mayoría de las drogas antidepresivas que se utilizan en la actualidad, cuyo mecanismo de acción es la inhibición de los SERT, como por ejemplo el citalopram, la fluoxetina y la fluvoxamina, denominados inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) (Keller et al. 1992; Holtzheimer & Nemeroff 2006). Los ISRS al inhibir a los SERT impiden que la serotonina sea recaptada al terminal sináptico y por lo tanto promueven su acumulación en la hendidura sináptica, generando un aumento en la neurotransmisión serotoninérgica. Este efecto bioquímico coincide con la aparición del efecto antidepresivo observado en la clínica, por lo que se asocia como principal mecanismo de acción terapéutico (Holtzheimer & Nemeroff 2006).

Sin embargo, existen dos problemas importantes que surgen del tratamiento con los ISRS. En primer lugar, existe un retraso significativo entre el inicio del tratamiento y la aparición del efecto terapéutico deseado, y en segundo lugar, muchos pacientes no responden al tratamiento con estos fármacos antidepresivos. Es así que, los tratamientos actuales disponibles no tienen efecto en muchos pacientes y/o tienen efectos incompletos para muchos otros (Trivedi 2006). Por lo tanto, el efecto bioquímico, es necesario pero no suficiente para explicar los síntomas depresivos, por lo que aún continúa siendo necesario profundizar en el estudio de la interacción del sistema serotoninérgico con otros sistemas de neurotransmisores o neuromoduladores, que permitan desarrollar estrategias que refuercen los efectos terapéuticos de los antidepresivos serotoninérgicos utilizados en la clínica.

3. Sistemas de neuropéptidos.

Diversas evidencias sugieren que otros sistemas de neurotransmisión, como los neuropéptidos podrían participar en los estados depresivos. Los neuropéptidos son péptidos de entre 10 y 100 aminoácidos que funcionan como neurotransmisores/neuromoduladores y a menudo están localizados en regiones cerebrales que median conductas emocionales y la respuesta al estrés. Estos neuropéptidos, que incluyen a la sustancia P (SP), el factor liberador de corticotropina (CRF), el neuropéptido Y (NPY),

la vasopresina (VP), la oxitocina (OT), la galanina (Gal) y la hormona concentradora de melanina (MCH), entre otros, actúan a través de la unión a receptores metabotrópicos específicos (Hökfelt et al. 2000). Estudios preclínicos realizados utilizando modelos animales de depresión, reportaron alteraciones en las respuestas comportamentales a través de la manipulación genética de neuropéptidos (Holmes et al. 2003). Además, se han desarrollado y probado una serie de nuevos compuestos que actúan sobre receptores de neuropéptidos tanto en modelos animales como en pacientes con depresión mayor (Rotzinger et al. 2010). Por ejemplo, en un ensayo clínico los síntomas de ansiedad y depresión en pacientes con depresión mayor se redujeron durante el tratamiento con un antagonista del receptor CRF1 (Zobel et al. 2000).

3.1. Hormona concentradora de melanina (MCH).

La MCH fue inicialmente aislada de la glándula pituitaria de salmón (Kawauchi et al. 1983), donde actúa como un factor que media el cambio de color de la piel en los peces teleosteos. En mamíferos, es un neuropéptido cíclico de 19 aminoácidos (figura 7), que ya no actúa como hormona sino que actúa como neuromodulador/neurotransmisor y juega un papel dominante en la regulación central de la homeostasis energética y el comportamiento alimenticio (Qu et al. 1996; Nahon 2006). Su función biológica está mediada por dos tipos de receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G (G-proteincoupled receptors), MCHR-1 y MCHR-2 que se expresan en la superficie de las membranas plasmáticas (Nahon 2006; Saito & Nagasaki 2008). Diversas evidencias han demostrado que la MCH tiene un rol principalmente inhibitorio tanto a nivel presináptico, donde disminuye la liberación de GABA y glutamato, como a nivel postsináptico (MacNeil 2013).

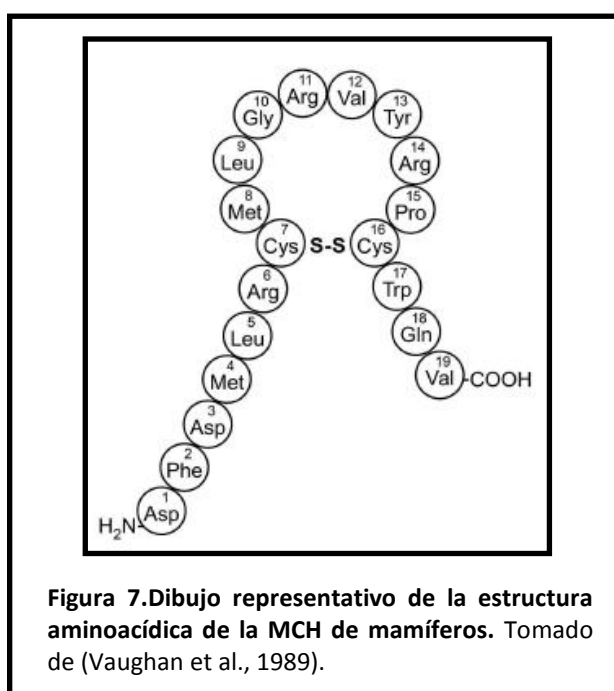
En ratas adultas las neuronas que contienen MCH han sido descritas en el hipotálamo lateral (LHA) y en el área incerto-hipotalámica (Bittencourt et al. 1992; Bittencourt & Celis 2008; Torterolo et al. 2006). Las neuronas MCHérgicas envían proyecciones difusas a distintas regiones del SNC, entre ellas a áreas del tronco encefálico que están involucradas en las funciones de sueño y vigilia tales como el NDR, el locus coeruleus, la sustancia gris periacueductal ventral y laterodorsal, y el núcleo tegmental-pedunculopontino (figura 8); una gran densidad de ARNm para los receptores MCHR-1 también están presentes en estas áreas (Bittencourt et al. 1992; Hervieu et al. 2000; Lagos et al. 2009).

Las neuronas MCHérgicas también están relacionadas con el ciclo sueño-vigilia. Reportes recientes en ratas, han mostrado que estas neuronas están activas durante el sueño, predominantemente durante el sueño REM (Hanriot et al. 2007; Verret et al. 2003). Además, hay un gran incremento en el sueño

REM luego de microinyecciones intracerebroventriculares de MCH; consecuentemente, ha sido sugerido que la MCH presenta un rol importante en el control del sueño REM (Tortero et al. 2011).

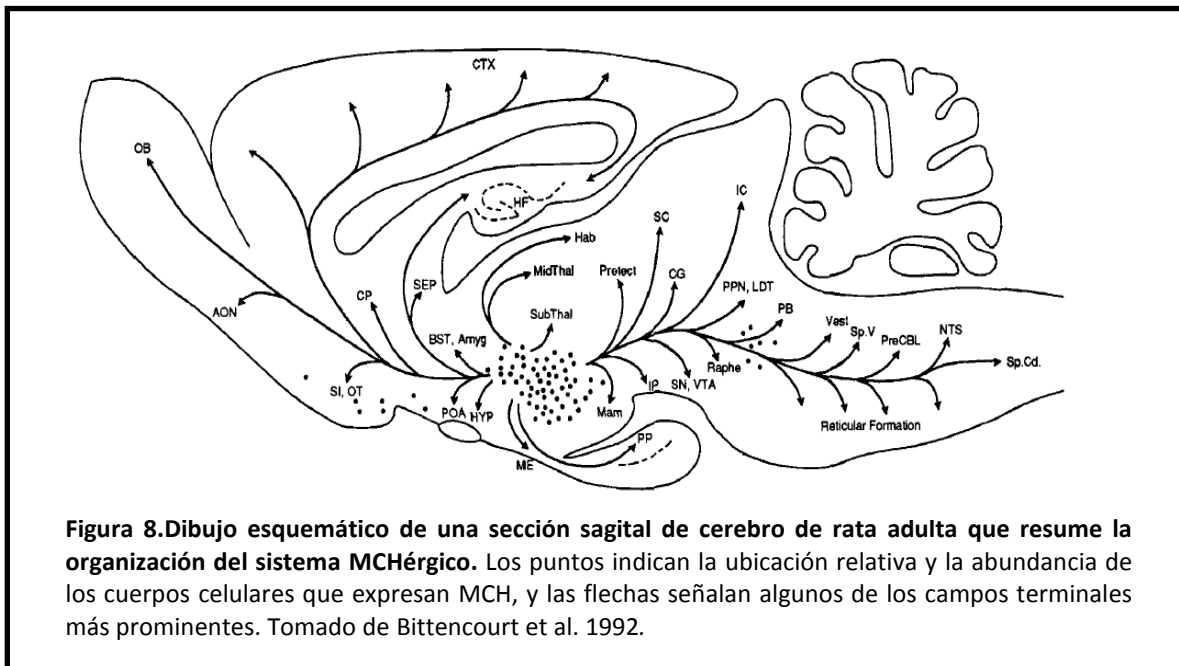
3.2. Biosíntesis.

Al igual que otros neuropéptidos, la MCH, se genera a partir del clivaje diferencial mediado por endoproteasas de un precursor, la Pre-pro-MCH de 165 aminoácidos, que da lugar a dos neuropéptidos adicionales denominados E-I (neuropeptideglutamic-isoleucine, NEI) y G-E (neuropeptideglycine-glutamicacid)(Nahon et al. 1989; Viale et al. 1999). Ambos neuropéptidos están activos en el SNC, aunque sus funciones han sido menos estudiadas(Bittencourt & Celis 2008;Parkes & Vale 1992).



3.3. Almacenamiento.

La MCH es empaquetada en vesículas sinápticas de centro denso, transportadas de forma anterógrada a lo largo de los axones neuronales para ser almacenadas y liberadas en las terminales sinápticas (Brownstein 1980). Los neuropéptidos están comúnmente presentes junto con neurotransmisores clásicos de bajo peso molecular en neuronas (co-localización), aunque en diferentes compartimentos subcelulares: vesículas grandes de centro denso para los neuropéptidos y pequeñas vesículas sinápticas claras para los neurotransmisores clásicos (Fried et al. 1985; Zhu et al. 1986). Para la MCH se ha reportado que el neurotransmisor inhibitorio GABA se encuentra en las neuronas MCH (Meister 2007; Harthoorn et al. 2005).



3.4. Liberación.

Las vesículas grandes de centro denso se localizan lejos de la membrana pre-sináptica, solas o en racimos. La liberación de dichas vesículas ocurre en cualquier parte de la membrana terminal, incluyendo (menos frecuentemente) las zonas activas (Karhunen et al. 2001; Zhu et al. 1986). Recientemente se ha calculado que una proporción particularmente alta de eventos de liberación, aproximadamente el 50% ocurre en lugares extra-sinápticos como las varicosidades (de Wit et al. 2009). En general, la liberación de neuropéptidos se desencadena por un aumento comparativamente pequeño en la concentración de Ca^{2++} intracelular global en las neuronas (menos de 1 mM), mientras que la liberación de neurotransmisores clásicos requiere de un aumento de la concentración de Ca^{2++} intracelular local significativo (10-100 mM) (Ghijssen & Leenders 2005). Esta aparente paradoja es de hecho una consecuencia de la localización precisa de las vesículas que contienen a los neurotransmisores clásicos en las sinapsis. En terminales con vesículas de centro denso y vesículas de centro claro, un aumento focal en la concentración de Ca^{2++} en los microdominios de la membrana sináptica conduce a una descarga preferencial de neurotransmisores clásicos, mientras que una elevación más general de Ca^{2++} dentro del terminal favorece la liberación de los neuropéptidos (Verhage et al. 1991). Así, las vesículas con-

teniendo los neuropéptidos requieren trenes de potenciales de acción sostenida para que el Ca^{2+} alcance dentro de los terminales niveles globales suficientes para desencadenar la liberación (Kits et al. 1997).

3.5. Actividad sináptica.

La MCH ejerce sus efectos a través de dos tipos de receptores, MCHR-1 y MCHR-2, siendo el MCHR-1 el único receptor funcional en roedores (Chung et al. 2009). MCHR-1 se localiza en la membrana plasmática de muchos tipos de células dentro y fuera del SNC y activa varias vías de señalización intracelular mediante el acoplamiento a las proteínas $\text{G}\alpha_q$, $\text{G}\alpha_i$ y $\text{G}\alpha_o$ (Chen et al. 2002).

En líneas celulares recombinantes como las células CHO, se pudo establecer que el ligando natural, MCH, se une a MCHR-1 con una afinidad de $\sim 1\text{nM}$, y se acopla a las proteínas G_i , G_o y G_q (Hawes et al. 2000). De este modo, la activación de MCHR-1 conduce a un aumento de la acumulación de Ca^{2+} intracelular que actúa a través de la vía acoplada a G_q y/o a la disminución de los niveles de AMPc a través de la vía acoplada a G_i/o (Pissios et al. 2003).

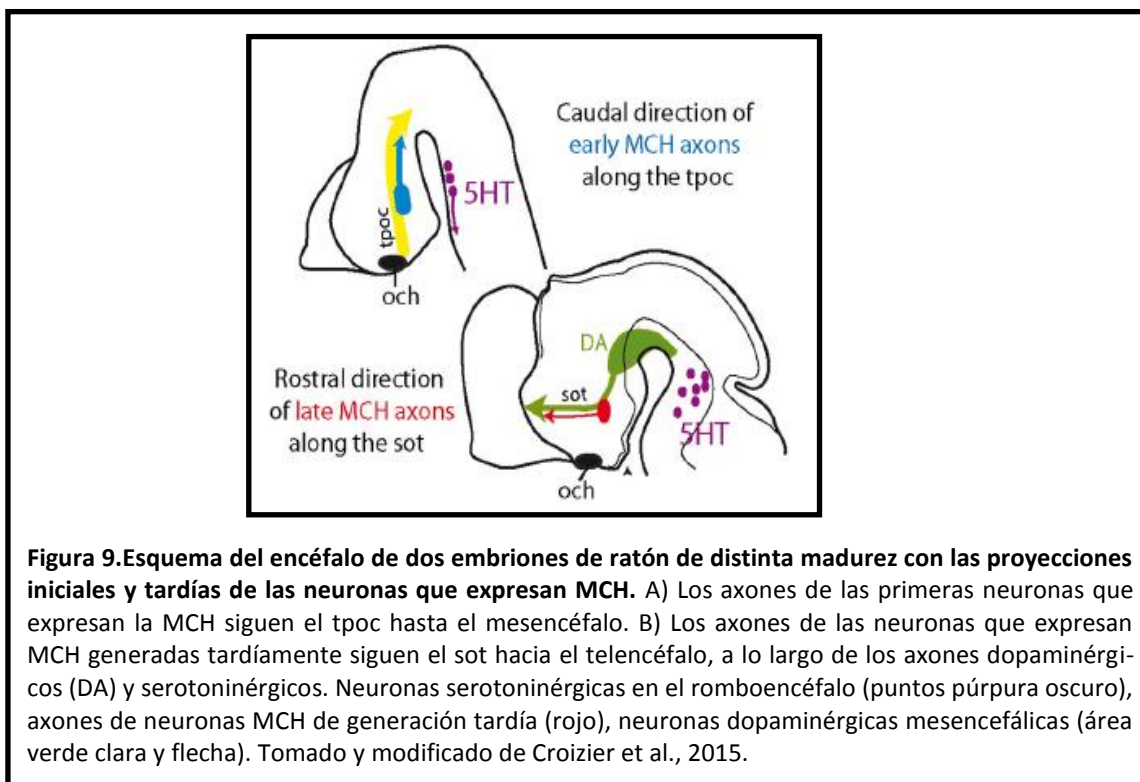
3.6. Internalización y desensibilización del receptor.

La señalización por receptores acoplados a proteína G (GPCR) está estrictamente regulada por múltiples mecanismos que actúan en diferentes niveles de propagación de la señal. Muchos GPCR se transfieren de la membrana plasmática a compartimentos intracelulares tras la estimulación por agonistas, un proceso que se denomina internalización de receptores. A su vez, esta internalización modula la capacidad de respuesta de las células y contribuye así a la disminución rápida observada de la respuesta a un agonista, que se denomina desensibilización. Para la MCH, la internalización inducida por MCH de MCH1R se produce a través de un proceso dependiente de proteína quinasa C, β -arrestin-2- y dinamina I (Saito et al. 2004).

3.7. Ontogenia del sistema MCHérgico.

Para estudiar el desarrollo embrionario de las neuronas MCHérgicas, Brischoux et al., 2001 utilizaron bromodesoxiuridina (BrdU) y encontraron que las neuronas MCHérgicas son generadas entre los estadios E10 y E16 de la vida embrionaria de ratas, con un pico en su génesis alrededor de E13. La combinación de BrdU, un trazador axonal e inmunohistoquímica para MCH, mostró que existen diferencias en la génesis de las neuronas MCHérgicas dependiendo del blanco de acción de sus fibras (Brischoux

et al. 2001). Posteriormente, Brischoux et al., 2002, encontraron que las neuronas que proyectan hacia la médula espinal son masivamente generadas en E11, mientras que las que proyectan a la corteza cerebral son generadas entre E12 y E13, y se describió la presencia de fibras orientadas caudalmente en el mesencéfalo de embriones E14(Brischoux et al. 2002) (Figura 9).



Estos resultados confirman la existencia de al menos dos sub-poblaciones de neuronas MCHérgicas, y que la etapa embrionaria determina su aparición temporal diferencial. Así mismo, en E14, todos los cuerpos celulares marcados mostraron un aspecto inmaduro, siendo de pequeño tamaño, con un núcleo voluminoso y un anillo delgado de citoplasma alrededor de él (Brischoux et al. 2001).

Antecedentes particulares.

1. Relación entre el sistema serotoninérgico y el Sistema MCHérgico.

Varias evidencias científicas han demostrado que el sistema MCHérgico podría estar interconectado con el sistema serotoninérgico a nivel de uno de los núcleos del rafe, el NDR. Por ejemplo se ha descrito una extensa presencia de fibras MCHérgicas en el NDR de ratas adultas (Bittencourt et al. 1992).

Además, la administración de MCH en el NDR produjo un gran incremento en el tiempo en que los animales permanecen en sueño REM, así como también produjo un leve incremento en el sueño de ondas lentas acompañado de una disminución en la vigilia y el sueño ligero (Lagos et al. 2009). Por otra parte, el antagonismo de los MCHR-1 por SNAP-7941, produjo un perfil antidepresivo en el test de nado forzado (TNF)(Borowsky et al. 2002). El TNF es un modelo que clásicamente se utiliza para la evaluación del perfil antidepresivo de diversas sustancias, aunque también posee la sensibilidad para evidenciar efectos comportamentales de tipo pro-depresivos (Porsolt et al. 1978).

En base a que en el NDR existe una densa inervación MCHérgica y que en ese núcleo se concentran las neuronas serotoninérgicas, cuya disfunción estaría relacionada con la depresión, surgió la hipótesis de que la MCH podría participar en dicha patología, modulando al sistema serotoninérgico. Para responder a esta pregunta, Lagos et al. 2011, estudiaron los efectos comportamentales en la prueba de nado forzado inducida por microinyecciones de MCH en el NDR(Lagos, Torterolo, et al. 2011) demostrando un comportamiento de tipo pro-depresivo, asociado a un aumento de inmovilidad, que fue prevenido por la fluoxetina. Además, reportaron que la inmunoneutralización de la MCH liberada en el NDR disminuyó el tiempo de inmovilidad, lo que evidenció un efecto de tipo antidepresivo (Lagos, Urbanavicius, et al. 2011).

Por otra parte, Urbanavicius et al, 2014, realizaron una caracterización detallada (tiempo y dosis dependencia) de los efectos en el comportamiento provocados por la inyección de MCH intra-NDR en ratas adultas utilizando el TNF. La especificidad de la acción de MCH se estudió utilizando un pretratamiento intra-NDR con ATC (potente antagonista de MCH con una alta afinidad por MCHR-1) y además, se evaluó si el pre-tratamiento sistémico con nortriptilina, un antidepresivo tricíclico y un inhibidor de la recaptación de noradrenalina, revertiría los efectos pro-depresivos provocados por la MCH. Los resultados mostraron que el efecto de la MCH era dependiente del tiempo y la dosis, y que el ATC, revirtió significativamente los efectos de MCH. Finalmente, se observó que el pretratamiento sistémico con nortriptilina evitó el efecto conductual producido por la microinyección de MCH intra-NDR. Por tanto, Urbanavicius et al, 2014, mostraron que el mecanismo de acción de la MCH en el NDR está mediado por MCHR-1 y que probablemente involucra una modulación de la neurotransmisión serotoninérgica y noradrenérgica (Urbanavicius et al. 2014).

Para continuar con el estudio de la interacción del sistema serotoninérgico y MCHérgico, sería de gran importancia disponer de una herramienta simple que permita estudiar los efectos del agonismo de

MCH sobre la neurotransmisión serotoninérgica. En este sentido, el cultivo primario de neuronas serotoninérgicas podría ser un preparado adecuado.

2. Cultivo primario como herramienta para el estudio in vitro de la fisiología de sistemas de neurotransmisión.

Los cultivos celulares primarios están constituidos por células dispersas que se cultivan directamente a partir de tejidos y tienen una vida útil limitada (Humpel 2015). Los cultivos primarios de neuronas del SNC, han sido ampliamente utilizados como un modelo adecuado en el campo de la neurobiología. Entre sus ventajas, se destaca que permiten explorar de forma relativamente más simple diferentes aspectos del funcionamiento neuronal de lo que sería posible en modelos animales, incluyendo la función sináptica, la morfología, la neurotoxicidad y la liberación de neurotransmisores.

Una de las mayores ventajas de los cultivos primarios es que las células crecen en un ambiente cuyo entorno puede ser controlado y que permite manipulaciones farmacológicas de células vivas que pueden ser identificadas de forma clara y precisa en cuanto a su fenotipo neuroquímico. El uso de células aisladas elimina los problemas asociados con la difusión y acceso de las drogas que presentan los tejidos intactos in vivo. Al ser un sistema menos complejo, resulta más simple la interpretación de los resultados (Humpel 2015).

Las principales desventajas del cultivo de células neurales primarias son la pérdida de las vías sinápticas normales, la pérdida de las relaciones anatómicas normales y cambios en la expresión génica. Sin embargo, los estudios indican que la mayoría de los tipos de células neuronales expresan propiedades similares in vitro e in vivo (Giffard & Ouyang 2010).

2.1. Cultivo primario de neuronas romboencefálicas.

Dada la importancia del sistema serotoninérgico en el funcionamiento del SNC, diferentes autores han desarrollado aproximaciones para cultivar estas neuronas in vitro. Las primeras neuronas serotoninérgicas cultivadas fueron obtenidas a partir de explantos de rafe medial de cerebro de ratas recién nacidas. Las neuronas serotoninérgicas crecieron hasta 16 días en cultivo y fueron capaces de liberar al medio 5-HIAA después del tratamiento con triptófano radiactivo (Halgren & Varon 1972).

Yamamoto et al. (1981), de acuerdo a evidencias previas de detección de la serotonina en células localizadas a lo largo de la línea media del tronco encefálico del embrión de rata en E12-E13 (Olson & Seiger 1972), desarrollaron cultivos disociados de dicha zona de embriones rata en E14 y E15. Estos cultivos contenían neuronas serotoninérgicas que fueron viables por más de 5 semanas en condiciones adecuadas de cultivo.

Liu & Lauder, (1991), por otra parte, señalaron la existencia de un período de sensibilidad crítico a la serotonina, entre los días embrionarios 14 y 15, para la adecuada supervivencia y crecimiento de las neuronas serotoninérgicas. Este período sensible corresponde a las fases iniciales de la neurogénesis del rafe en el embrión, cuando las neuronas serotoninérgicas forman el agregado de neuronas conocido como el complejo B4-B9 y se extienden los procesos cortos entre los grupos bilaterales de neuronas serotoninérgicas localizadas en el romboencéfalo. Los efectos estimulantes, como el tratamiento con nialamida y L-cisteína, sobre los cultivos de E14 ya no se observaron en E15 (Liu & Lauder 1991). Sin embargo, estudios posteriores han tenido un éxito variable en el establecimiento de cultivos de romboencéfalo enriquecidos en neuronas serotoninérgicas obtenidos de ratas en los estadios de E13 a E15 (Lautenschlager et al. 2000; Czesak et al. 2007; Galter et al. 1999).

Así, Lautenschlager et al. (2000), determinaron que las neuronas serotoninérgicas en E14 son capaces de almacenar y liberar serotonina a los dos días después de ser cultivadas. Durante 14 días *in vitro* (DIV), evidenciaron el desarrollo continuo de los somas serotoninérgicos, obteniendo en promedio 4 % de neuronas positivas para serotonina. Además, se evidenció el incremento en la formación de neuritas serotoninérgicas dando lugar a una densa red de fibras (Lautenschlager et al. 2000).

Czesak et al. (2007), a su vez, caracterizaron a partir de embriones de rata en E13-E15, un cultivo primario de rafe rostral enriquecido en neuronas serotoninérgicas y obtuvieron para 7 DIV: 8% de neuronas inmunopositivas para marcadores serotoninérgicos; 5% para la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, marcador glial); 1% para tirosina hidroxilasa (TH, marcador catecolaminérgico) y 54% para GAD65/67, enzima de síntesis de GABA, utilizado como marcador de neuronas GABAérgicas (Czesak et al. 2007).

En estudios anteriores, Hery et al. (1999), profundizaron en los mecanismos autoregulatorios que afectan la liberación y síntesis de serotonina en cultivos primarios de romboencéfalo de embriones de rata en E14. Evaluaron la presencia de los receptores 5-HT1A y 5-HT1B en neuronas serotoninérgicas a través de experimentos realizados con TTX, y los resultados obtenidos sugirieron que los receptores 5-HT1A se encuentran localizados en el compartimento somatodendrítico, mientras que los receptores

5-HT1B están localizados en las terminaciones nerviosas de las neuronas embrionarias, tal como se ha descrito para el cerebro adulto (Héry et al. 1999). Además, estudiaron mediante aproximaciones bioquímicas la participación de los receptores 5-HT1A y 5-HT1B en el control de la síntesis y liberación de serotonina, concluyendo que los mecanismos de autorregulación por dichos autorreceptores se encuentran funcionalmente maduros en cultivos primarios del NDR en etapas iniciales del desarrollo (Héry et al. 1999).

Asimismo, BIRTHELMER et al. (2006), presentaron evidencia funcional de que la liberación de serotonina tanto espontánea como evocada eléctricamente en cultivos primarios de neuronas romboencefálicas en embriones de rata en E15, es modulada a través de los autorreceptores 5-HT1B y los heterorreceptores adrenérgicos α_2 , como ocurre en las regiones blanco de las fibras serotoninérgicas ascendentes en un cerebro de rata adulto (BIRTHELMER et al. 2006). Además, al menos la liberación de serotonina evocada eléctricamente también parece ser modulada por los autorreceptores del subtipo 5-HT1A (BIRTHELMER et al. 2006).

3. Métodos de cuantificación de los niveles de serotonina.

Existen diversas técnicas para cuantificar los niveles de los neurotransmisores monoaminérgicos presentes en muestras de sangre o tejido, incluyendo fluorescencia, luminiscencia química, voltametría y electroforesis capilar, a través de métodos fotométricos o de otros métodos colorimétricos que están limitados por fluorescencia y absorptividad molar bajas, respectivamente (Patel et al. 2005).

En los últimos años, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, de sus siglas en inglés: high performance liquid chromatography) se ha utilizado ampliamente para el análisis de muestras biológicas. Es una técnica muy eficaz, ya que permite la separación y análisis de los componentes dentro de la matriz neuroquímica. La HPLC con detección electroquímica (ED: electrochemical detection) ha sido ampliamente utilizada para la determinación de aminas biogénicas en muestras de sangre, tejido, LCR y de microdiálisis intracerebral (Cheng & Kuo 1995; Patel et al. 2005).

La técnica de HPLC permite separar mezclas moleculares, basada en la afinidad diferencial de los solutos entre dos fases inmiscibles, la fase estacionaria y la fase móvil. La detección electroquímica mide la corriente generada por un electrodo de trabajo, el cual se fija con respecto a un electrodo de referencia. Cuando se coloca el electrodo en un caudal de fase móvil, éste generará una corriente de fondo debido a la oxidación de las impurezas de la fase móvil. Cuando el analito electroquímicamente

activo pasa por el electrodo de trabajo será oxidado (o reducido), aumentando la corriente de fondo. La concentración de dicho analito en una muestra problema puede ser calculada por comparación con la corriente generada por una muestra de concentración conocida del mismo (Mefford 1981).

En relación a la cuantificación de serotonina por HPLC-ED, esta monoamina ha podido ser cuantificada en distintos tipos de muestras como LCR, sangre o tejido, entre otros. En cultivos neuronales primarios u organotípicos, son pocos los trabajos que han cuantificado los niveles endógenos de serotonina. Nagayasu et al. (2010) y (2013), determinaron los niveles de serotonina extracelulares de cultivos organotípicos obtenidos a partir de ratas posnatales (P2-P3) en secciones coronales (350 μm de espesor) de tronco encefálico conteniendo el NDR y NMR. Utilizaron HPLC-ED y cuantificaron los niveles de serotonina y 5-HIAA luego del tratamiento agudo y crónico con citalopram, paroxetina, fluoxetina (Nagayasu et al. 2010) y desipramina, imipramina, duloxetina y milnacipran, entre otros drogas antidepresivas (Nagayasu et al. 2013). En cultivos primarios, Paolillo et al. (1993), cuantificaron el contenido celular endógeno de serotonina y 5-HIAA en cultivos mesencefálicos de embriones de rata E16 de 12 DIV (Paolillo et al. 1993).

Hipótesis.

En base a todo lo expresado anteriormente, la hipótesis de trabajo de la presente Tesis de Maestría, es que el cultivo primario de romboencéfalo, es un preparado adecuado para el estudio de la modulación de las neuronas serotoninérgicas por la MCH.

Objetivo general.

El objetivo general de este trabajo fue el establecimiento de un modelo celular para el estudio de la modulación de las neuronas serotoninérgicas por la MCH.

Objetivos específicos.

1. Identificación de neuronas serotoninérgicas y fibras MCHérgicas en cortes sagitales de embriones de rata en E14 mediante la técnica de inmunohistoquímica.
2. Caracterización fenotípica del cultivo primario de romboencéfalo: identificación de fenotipos neuronales serotoninérgicos, catecolaminérgicos y GABAérgicos, y astrocitos, mediante inmunofluorescencia.
3. Caracterización funcional del cultivo primario de romboencéfalo: a) cuantificación de niveles basales intracelulares y extracelulares de serotonina y de su principal metabolito (5-HIAA) por HPLC-ED, y b) cuantificación de los niveles extracelulares de serotonina y 5-HIAA luego del tratamiento con diferentes compuestos.
4. Modulación de las neuronas serotoninérgicas en cultivo por la MCH.

Metodología.

1. Identificación de neuronas serotoninérgicas (5HT y SERT) y fibras MCHérgicas en cortes sagitales de embriones de rata en E14.

1.1. Cortes a congelación.

La rata hembra con una preñez de 14 días se sacrificó por decapitación y los cuernos uterinos fueron rápidamente extraídos por cesárea. Posteriormente los fetos fueron extraídos de sus sacos vitelinos mediante micro pinzas y colocados en paraformaldehído (PFA, hecho en buffer fosfato 0,1 M, pH= 7,4) al 4% durante 48 horas para su fijación. Posteriormente se procedió a la crioprotección con sacarosa al 30% en buffer fosfato (PB) 0,1 M durante 48 horas. Finalmente se congelaron los embriones con hielo seco en bloques con Tissue-tek y fueron mantenidos a una temperatura de -80°C hasta su corte en el crióstato.

Los cortes sagitales, tuvieron un espesor de $20\ \mu\text{m}$, y fueron levantados en láminas del tipo superfrost tomando como referencia al Atlas of the Developing Rat Nervous System de Paxinos, G. (Paxinos 1995) de un embrión de rata en E14. Los cortes fueron finalmente almacenados a -20°C hasta su procesamiento para la realización de la inmunohistoquímica.

1.2. Inmunohistoquímica.

Para detección de serotonina, SERT y fibras MCHérgicas en cortes sagitales de embriones de rata en E14 montados en lámina, se utilizó la técnica de inmunohistoquímica en lámina y en cortes secuenciales.

Se realizaron tres lavados en PBS 0,1M cada uno de 10 minutos; posteriormente se procedió al bloqueo de las peroxidasas endógenas con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 1%, durante 60 minutos a temperatura ambiente. Nuevamente se realizaron tres lavados con PBS, para luego, bloquear los sitios inespecíficos con suero normal de burro (NDS) al 3% y albúmina de suero bovino (BSA) al 2%. La incubación con los anticuerpo primarios (goat anti-5HT 1/10000, rabbit anti-SERT 1/5000, y rabbit anti-MCH 1/10000 (Immunostar)) en PBS-TRITÓN 0,3% y NDS 3%, se realizó durante toda la noche a temperatura ambiente en cámara húmeda.

Se continuó el procedimiento con nuevos lavados con PBS 0,1M de 3, 5, 7, 7 y 10 minutos. La incubación con el anticuerpo secundario biotinilado (donkey anti-rabbit 1/600) en PBS-TRITÓN 0,3% y NDS

3%, fue de 90 minutos. Posteriormente a los lavados, se incubó con el KIT ABC (complejo avidina-biotina, 1/600, Vector Laboratories) durante 60 minutos. Luego se lavó con PBS 0,1M. El revelado se realizó incubando los cortes con H₂O₂ y diaminobencidina (DAB) durante 10 minutos (Kit DAB Vector). La reacción se detuvo con un lavado en agua destilada. La marcación específica se observó como una coloración marrón debido al precipitado de DAB.

Las láminas se dejaron secar y luego se deshidrataron y montaron con Histomount. Se observaron en un microscopio Olympus CH30 y se obtuvieron fotos en la lupa Nikon SMZ1000, con el software Micrometrics Standard Edition Premiun.

2. Caracterización morfológica del cultivo primario de romboencéfalo.

2.1. Cultivo primario de romboencéfalo.

Todos los procedimientos de experimentación con animales se llevaron a cabo de acuerdo con los requisitos del Comité de Bioética del IIBCE, y del Comité de Ética de la Facultad de Medicina (No expediente 070153-000515-13) y de la Ley Nacional de Experimentación Animal N ° 18.611.

Los cultivos primarios enriquecidos en neuronas serotoninérgicas se prepararon a partir de embriones obtenidos de ratas Sprague-Dawley en el día 14 (E14) de gestación de acuerdo al protocolo de Lautenschlager et al. (2001), con modificaciones.

Para la realización de cada cultivo se conformaron dos harenes compuestos por tres hembras y un macho cada uno. Se contó como día 1 (E1) el día posterior a la cópula, cuando se realizó el frotis vaginal y se verificó la presencia de espermatozoides.

La hembra con una preñez de 14 días fue sacrificada por decapitación y los cuernos uterinos fueron rápidamente extraídos por cesárea. En promedio se obtuvieron entre 11 y 15 embriones por hembra a lo largo de todo los experimentos realizados en el desarrollo de esta tesis.

Para obtener cultivos celulares viables, sin contaminación ya que se trabajó sin antibióticos todos los procedimientos a partir de la extracción de los cuernos uterinos de la hembra se realizaron en condiciones de esterilidad (bajo campana deflujo laminar). Se extrajeron los fetos de los cuernos uterinos y de sus sacos vitelinos mediante micro pinzas y se colocaron en buffer fosfato salino (PBS) frío. De cada embrión se disecó, bajo lupa estereoscópica y en campana de flujo laminar, la zona ventral del romboencéfalo, la cual contiene los núcleos del rafe según la metodología empleada por Lautenschlager

et al.(Lautenschlager et al. 2000). En cada cultivo se colectó la zona del romboencéfalo de entre 11 y 30 embriones en 1 ml de medio de cultivo compuesto por Neurobasal (Gibco, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA), B-27 al 2% (Gibco, Thermo Fischer Scientific) y L-glutamina (2mM)(Sigma-Aldrich, San Luis, MI, USA). Las células fueron disociadas mecánicamente mediante micropipeta en 3 ml de medio de cultivo, se dejó decantar la mezcla y posteriormente las células en suspensión fueron traspasadas a otro tubo. El proceso se repitió dos veces para aumentar el número de células obtenidas. La suspensión de células se centrifugó a 1000g durante 5 minutos y el pellet conteniendo las células se resuspendió en 3 a 5 ml de medio de cultivo (dependiendo del número de embriones disecados) para determinar la densidad celular en cámara de Neubauer bajo microscopio.

Para estos cultivos, se utilizaron multiplacas(Cellstar, GreinerBio-One, FrickenhausenGermany) de 24 o 48 pocillos (pocillos de 1,96 cm² y 1 cm² de superficie, respectivamente) cubiertas con poli-L-lisina (0.1 mg/ml, Sigma-Aldrich), compuesto sintético que promueve la adhesión y la absorción de proteínas mediante modificaciones de las cargas de superficie en el sustrato de cultivo. En el caso de la placa de 24 pocillos, la poli-L-lisina se aplicó sobre pequeños vidrios previamente colocados dentro de cada pocillo. Los cultivos realizados en dichas placas se destinaron para los ensayos de inmunofluorescencia, con posterior observación morfológica y obtención de imágenes por microscopía confocal.

Los cultivos sembrados en las placas de 48 pocillos se procesaron para obtener las muestras de sobrenadante y células, para posteriormente analizar los niveles de serotonina y 5-HIAA por HPLC-ED. En algunas de dichas placas, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia (en los pocillos en los cuales no se extrajeron las células) para la cuantificación de los distintos fenotipos neuronales, lo que fue determinado en microscopio invertido de epifluorescencia, como se indica posteriormente.

Se cultivaron 600.000 y 1x10⁶ células por pocillo en las placas de 48 y 24 pocillos respectivamente, y los cultivos fueron mantenidos en estufa a 37 °C, en atmósfera de CO₂ al 5% y con saturación de aguadurante 14 días. A los 7 DIV, los cultivos fueron alimentados, para lo cual se reemplazó la mitad del medio de cultivo por medio fresco. Además, a los 7 DIV se realizó la observación del cultivo bajo microscopio, para determinar la viabilidad de las células para continuar con los experimentos planificados a los 14 DIV.

En el desarrollo de esta tesis fueron realizados 67 cultivos primarios, de los cuales fueron viables 36 de ellos. Se cuantificaron los niveles de serotonina y 5-HIAA por HPLC-ED en 34 de estos cultivos y en 30 se realizó la cuantificación fenotípica. No todos los cultivos analizados por HPLC-ED tuvieron su corre-

lato morfológico. Asimismo, se realizaron cultivos exclusivamente para realizar los ensayos de inmunofluorescencia.

2.2. Detección de los diferentes fenotipos celulares en cultivo por inmunofluorescencia.

A los 14 DIV, los cultivos se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% y sacarosa al 5% durante 20 minutos en estufa a 37 °C. Posteriormente se lavaron con PBS, se permeabilizaron con Tritón X-100 0.1% en PBS durante 15 minutos y se realizó el bloqueo de los sitios inespecíficos con BSA (albúmina de suero bovino) al 5% en PBS durante 30 minutos. Luego se incubaron los cultivos con los correspondientes anticuerpos primarios a 4°C toda la noche y al día siguiente, posteriormente al lavado, se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios acoplados a distintos fluoróforos durante 60 minutos a temperatura ambiente. En el tercer lavado se incluyó Hoechst 33258 (colorante de intercalación de ADN, 1µg/ml, Sigma-Aldrich) para visualizar los núcleos celulares y determinar posteriormente las células viables del cultivo. Finalmente se lavaron con PBS. Se utilizaron anticuerpos primarios específicos para identificar neuronas serotoninérgicas; neuronas GABAérgicas; catecolaminérgicas, a través de la enzima de síntesis tirosina hidroxilasa (TH), y los astrocitos, a través de la detección de la proteína GFAP (tabla 2). Como control positivo para la identificación de astrocitos mediante GFAP, se realizó la inmunofluorescencia en un cultivo de neuronas obtenido de hipocampo en E18, para los cuales ya ha sido descrita la presencia de astrocitos (Abney et al. 1981).

En todos los casos, se omitió la incubación con el correspondiente anticuerpo primario en un pocillo como control negativo del ensayo.

2.3. Análisis de los ensayos de inmunofluorescencia.

Luego de los distintos ensayos de inmunofluorescencia, como se mencionó anteriormente, los vidrios con las células cultivadas de las placas de 24 pocillos se observaron y fotografiaron en un microscopio Olympus BX6 equipado con un módulo confocal FV300 y una cámara Olympus DP70S para obtener imágenes de calidad de los distintos fenotipos observados.

Los cultivos sembrados en las placas de 48 pocillos se observaron y fotografiaron en un microscopio invertido de fluorescencia Olympus IX81 equipado con una cámara Olympus DP71, para realizar posteriormente la cuantificación de núcleos Hoechst positivos, y de las células positivas para los diferentes anticuerpos primarios ensayados. El procesamiento de las imágenes se realizó en el programa Image J.

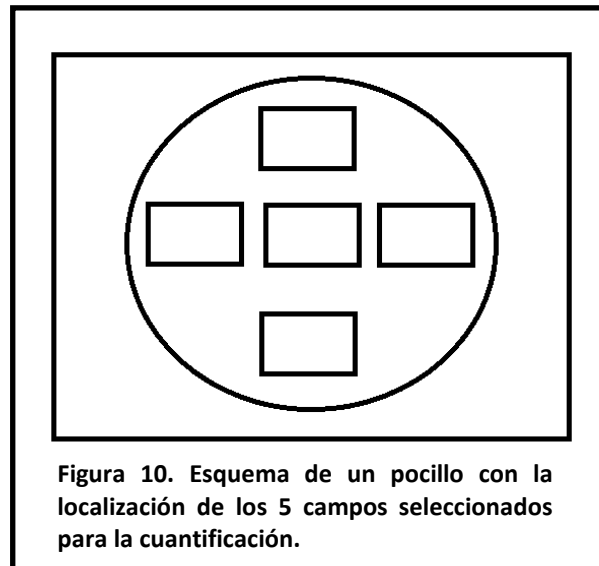
Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en los ensayos de inmunofluorescencia en los cultivos de romboencéfalo.

Anticuerpo primario	Concentración	Empresa	Anticuerpo secundario	Concentración	Empresa
Anti 5-HT (rabbit, poli-clonal)	1/500	Immunostar, Wisconsin, USA; #20080	Donkey anti-rabbit Alexa Fluor 594	1/1000	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Anti 5-HT (goat, poli-clonal)	1/500	Immunostar, Wisconsin, USA; #20079	Donkey anti-goat Alexa Fluor 594	1/1000	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Anti TH (mouse, monoclonal)	1/1000	Millipore, Billerica, USA, MAB318	Donkey anti-mouse Alexa Fluor 488	1/1000	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Anti GABA (rabbit, poli-clonal)	1/500	Immunostar, Wisconsin, USA, #20095	Donkey anti-rabbit Alexa Fluor 488	1/1000	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Anti GFAP (mouse, monoclonal)	1/400	Sigma-Aldrich, MS-1407	Donkey anti-mouse Alexa Fluor 488	1/1000	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA

Se cuantificó el número de células vivas y el número de neuronas serotoninérgica en 30 cultivos, y el número de neuronas GABAérgicas en 3 de esos 30 cultivos. Como criterio, se consideró que una célula estaba viva cuando los núcleos marcados con Hoescht se veían grandes y opacos.

Para la cuantificación del número de células viables, neuronas serotoninérgicas y neuronas GABAérgicas, se evaluaron 2 pocillos por cultivo. En cada pocillo se tomaron cinco fotos (1360 x 1024 píxeles) de campos distintos a 200 X de aumento (figura 10) y se cuantificó el número total de células vivas en

los 5 campos seleccionados de cada pocillo. Se sumaron dichas cifras para obtener el número total de células por pocillo, para posteriormente obtener el promedio de ambos pocillos. Luego se cuantificó el número de neuronas inmunomarcadas en dichos campos. El porcentaje total de neuronas serotoninérgicas y GABAérgicas en relación al total de células vivas, correspondió entonces, al promedio de esos 5 campos en ambos pocillos.



3. Caracterización funcional del cultivo primario de romboencéfalo.

3a. Cuantificación de niveles celulares y extracelulares de serotonina y 5-HIAA por HPLC-ED.

A los 14 DIV, se cuantificaron los niveles de serotonina y 5HIAA por HPLC-ED en las placas de cultivo de 48 pocillos. El método se basó en el descrito por Nagayasu et al. (2010), realizado en cultivos organotípicos de rodajas de rafe, con algunas modificaciones. Dicha cuantificación se realizó en muestras del medio extracelular (serotonina y 5HIAA liberada por las neuronas) y en las células en cultivo propiamente dichas. Para ello, se reemplazó el medio de cultivo por buffer de Krebs- Ringer Glucosa-Hepes (KRH) (NaCl1460 mM, KCl27 mM, MgCl10 mM, CaCl212 mM, D-glucosa100 mM, Hepes200 mM y Ácido ascórbico 2 mM). Los cultivos se incubaron a 37° C durante 15 minutos. Luego éste fue reemplazado por KRH, incubándose durante 30 minutos a 37°C (Nagayasu et al. 2010).

Posteriormente, las placas con las células se colocaron en hielo. Se recogió el medio de los pocillos y se le agregó ácido perclórico 1 M (PCA) para obtener una concentración final de PCA de 0.1 M. Las células se levantaron por rastrillado en 200 µl de PCA 0.1 M por pocillo. Las muestras de células fue-

ron sonicadas y luego ambos tipos de muestras (extracto de células y medio extracelular) fueron centrifugadas durante 10 minutos a 15000 rpm y 4°C para luego colectar los sobrenadantes y ser analizados por HPLC-ED.

El HPLC-ED (Waters 2465 Milford, MA, USA) utilizado, estaba equipado con una columna X-Bridge™ C-18 (Luna® 3 µm C18 (2) 100 Å, LC Column 100 x 2 mm; Phenomenex) que se mantuvo a 40°C y una precolumna (3,2 to 0,8 mm internaldiameter), con un sistema de detección electroquímico (Epsilon e5P, BASi, West Lafayette, IN, USA). El potencial de oxidación se fijó en +0,65V (electrodo de trabajo de carbón vítreo vs. electrodo de referencia Ag/AgCl). La fase móvil estaba compuesta por una solución de ácido cítrico (a pH = 3) que fue filtrada y desgaseada. Posteriormente se agregó octil sulfato de sodio (0,5 mM) y los solventes acetonitrilo (3%) y tetrahidrofurano (1,5 %). Dicha fase móvil circuló a una velocidad de flujo constante de 0,3 ml/min utilizando una bomba de HPLC (Waters 1525, Milford, MA, USA).

Para determinar las concentraciones de serotonina y 5-HIAA se comparó la señal obtenida en las muestras (altura de pico) con la de una solución estándar de ambos compuestos con concentración conocida (5pg/µl).

El volumen de inyección de las distintas muestras fue de 100µl con un tiempo total de análisis de 10-12 minutos por muestra.

El límite de detección del HPLC-ED se calcula a partir de la solución estándar. Para la serotonina, el límite de detección del sistema fue de $0,19 \pm 0,01$ ng y para el 5-HIAA fue de $0,32 \pm 0,15$ ng. Por otra parte, el tiempo promedio de elución de la serotonina fue de $8,0 \pm 1,2$ minutos desde el comienzo de la corrida cromatográfica, mientras que para el 5-HIAA el tiempo de elución fue de $4,5 \pm 0,6$ minutos. Estos datos son el resultado de la determinación y análisis de los tiempos de elución de 9 cultivos elegidos al azar de entre los 34 cultivos analizados.

3b. Modulación de las neuronas serotoninérgicas en cultivo mediante diferentes tratamientos farmacológicos.

Los cultivos se incubaron con KRH a 37° C durante 15 minutos, luego éste fue reemplazado por KRH sólo (muestras basales o controles), KRH con las distintas drogas o con KRH modificado (tabla 3), incubándose durante 30 minutos a 37° C.

Para preparar el KRH modificado, utilizado únicamente en el tratamiento con KCl, el KRH 1X con una concentración de KCl 27 mM, se llevó a una concentración de KCl 50 mM y se mantuvo la osmolaridad de la solución disminuyendo la concentración de NaCl.

Luego de realizados los tratamientos, se siguió el procedimiento descrito en Cuantificación de niveles celulares y extracelulares de serotonina y 5-HIAA por HPLC-ED(subítem 3.a., pág. 39).

Los datos obtenidos de los niveles de serotonina y 5-HIAA tanto endógenos como ante los distintos tratamientos farmacológicos, se analizaron con el software GraphPadPrism 5 y se expresaron como la media \pm desvío estándar (DE). Para cada tratamiento farmacológico fueron utilizados de tres a cinco cultivos, y cada dosis ensayada fue realizada por triplicado. Los valores obtenidos se promediaron y se expresaron como cambios en relación a los valores basales de cada cultivo. Se determinaron las diferencias significativas usando el t-test pareado o el test de ANOVA de una vía seguida por la prueba post-hoc de Tukey. Cuando fue aplicable, se realizó ANOVA pareado. Se consideró significancia estadística a un $P < 0,05$.

4. Cuantificación de los niveles de serotonina y 5-HIAA luego del tratamiento agudo con MCH.

La metodología empleada se describe en el ítem 3 de la Metodología, pág. 39.

Tabla 3. Compuestos utilizadas en los diferentes tratamientos farmacológicos en los cultivos primarios de rombo-encéfalo.

Droga	Concentraciones utilizadas	Mecanismo de acción	Constante de afinidad (Ki)	Empresa
KCl	50 mM	Depolarizante	—————	Sigma-Aldrich
EGTA	2 mM	Quelante de calcio	—————	Sigma-Aldrich
Citalopram	0.1, 1, 10 y 100 μ M	Inhibidor de la recaptación de serotonina	(SERT) 4 nM (Parnham et al. 1994)	Donado por Dr. J. Monti
Nortriptilina	1, 10 y 100 μ M	Inhibidor de la recaptación de noradrenalina	(SERT) 161 nM (Zhou 2004)	Urufarma
Clorgilina	1, 10 y 100 μ M	Inhibidor de la enzima MAO A	(MAO A) 0,18nM (Olmos et al. 1993)	Sigma-Aldrich
8-OH-DPAT	0,001, 0,01, 0,1 Y 1 μ M	Agonista del receptor 5HT 1A	(5HT 1A) 1,2 Nm (Naiman et al. 1989)	
WAY 100635	0,001, 0,01, 0,1 Y 1 μ M	Antagonista del receptor 5HT 1 ^a	(5HT 1A) 0,8 nM (Plenevaux et al. 2002)	Sigma-Aldrich
MCH	0,1, 1, 10 y 100 nM	Neuropéptido/neurotransmisor	—————	Phoenix Pharmaceuticals

Resultados.

1. Identificación de neuronas serotoninérgicas y fibras MCHérgicas en cortessagitales de embriones de rata en E14.

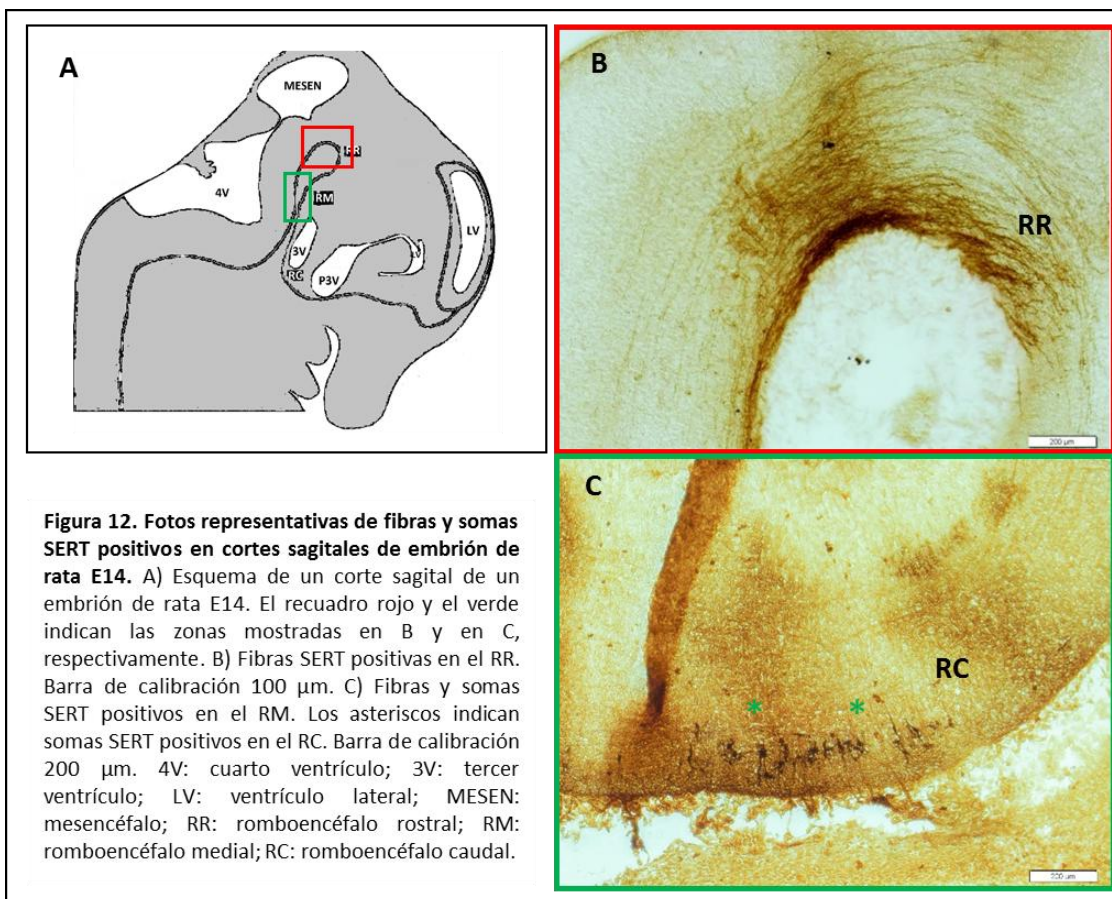
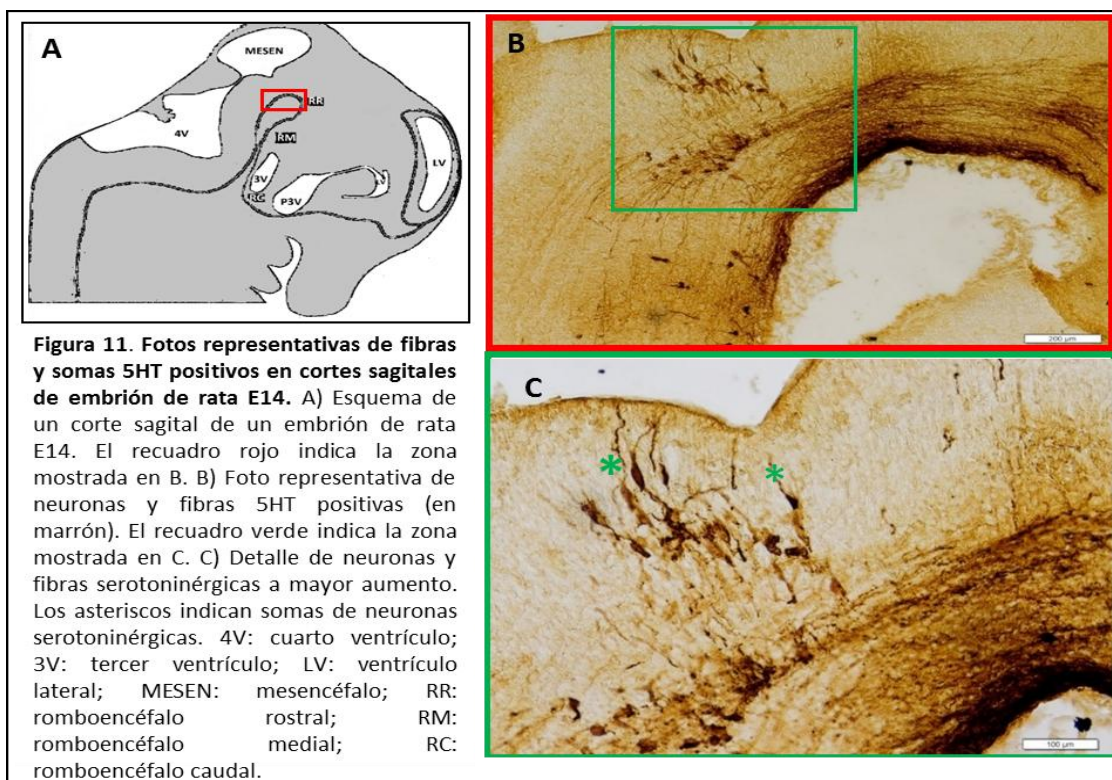
Las neuronas serotoninérgicas en el embrión de rata en E14 se localizaron en tres subgrupos celulares situados en el romboencéfalo; un grupo localizado en el romboencéfalo rostral, otro en el romboencéfalo medial y un tercero en el romboencéfalo caudal. Dichas neuronas presentaron una forma redondeada y con pocas neuritas que se extendían desde el soma. Sin embargo, pudieron observarse un gran conjunto de fibras que forman haces que se proyectan desde donde se localizan los somas a través de la curvatura ponto-mesencefálica (Figura 11).

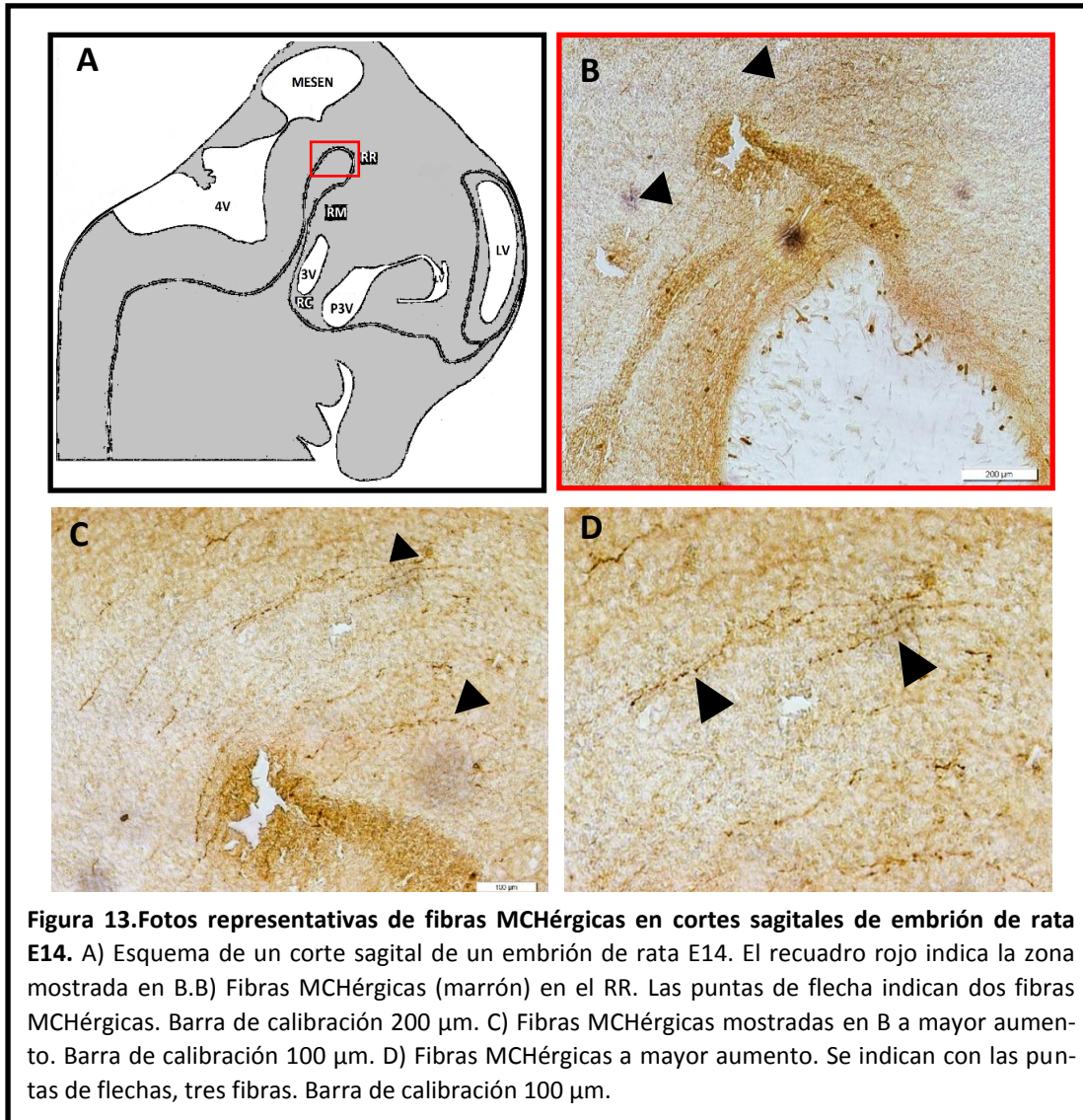
Asimismo, somas y procesos SERT positivos se hicieron evidentes en este estadio. Las fibras SERT positivas se localizaron en el romboencéfalo desde la zona rostral hasta la caudal, y se extendieron hacia la médula espinal. También pudieron observarse somas SERT positivos en las tres regiones del romboencéfalo (figura 12). Sin embargo, cualitativamente el número de somas SERT positivos fue notablemente menor que el número de somas 5HT positivos (no se realizó la cuantificación de dichas neuronas). En ambos ensayos los controles negativos realizados con omisión del anticuerpo primario no dieron marcas positivas en los embriones ensayados. Las fibras MCH positivas se localizaron principalmente en la zona rostral del romboencéfalo. Pudieron observarse también, la presencia de varicosidades a lo largo de toda su extensión. El correspondiente control mostró ausencia de marca.

2. Caracterización fenotípica del cultivo primario de romboencéfalo.

2.1. Neuronas serotoninérgicas.

Las neuronas serotoninérgicas en cultivo presentaron somas de forma redondeado, fusiforme o piriforme de entre 35 y 40 μm de diámetro con abundantes prolongaciones que se extendieron varias μm desde el soma (figura 14). También pudieron observarse en algunas zonas del cultivo, varicosidades a lo largo de varias de las neuritas, característica típica de neuronas serotoninérgicas (figura 15). La cuantificación de 30 cultivos primarios de romboencéfalo enriquecidos en neuronas serotoninérgicas de 14 DIV mostró un promedio de 1380 ± 608 células vivas y 28 ± 12 neuronas serotoninérgicas viables en el área analizada, lo que da como resultado un promedio de $2,2 \pm 0,7$ % de neuronas inmunopositivas para serotonina en relación al total de células vivas en cultivo.





2.2. Otros fenotipos celulares.

La cuantificación de 3 cultivos primarios de romboencéfalo de 14 DIV mostró un promedio de $56,7 \pm 7,6$ % de neuronas inmunopositivas para GABA. Las neuronas GABAérgicas presentaron un soma de forma piriforme, redondeada o fusiforme de entre 15 a 20 µm de diámetro con largas prolongaciones, siendo de menor tamaño que las serotoninérgicas (figura 16). Además, se observó que del total de neuronas GABAérgicas, el $4,6 \pm 2,8$ % también se encontraban inmunomarcadas para serotonina (figu-

ra 17). A los 14 DIV no fueron detectadas neuronas inmunopositivas para TH, ni astrocitos GFAP (+). En todos los ensayos los correspondientes controles negativos fueron negativos para los antígenos ensayados.

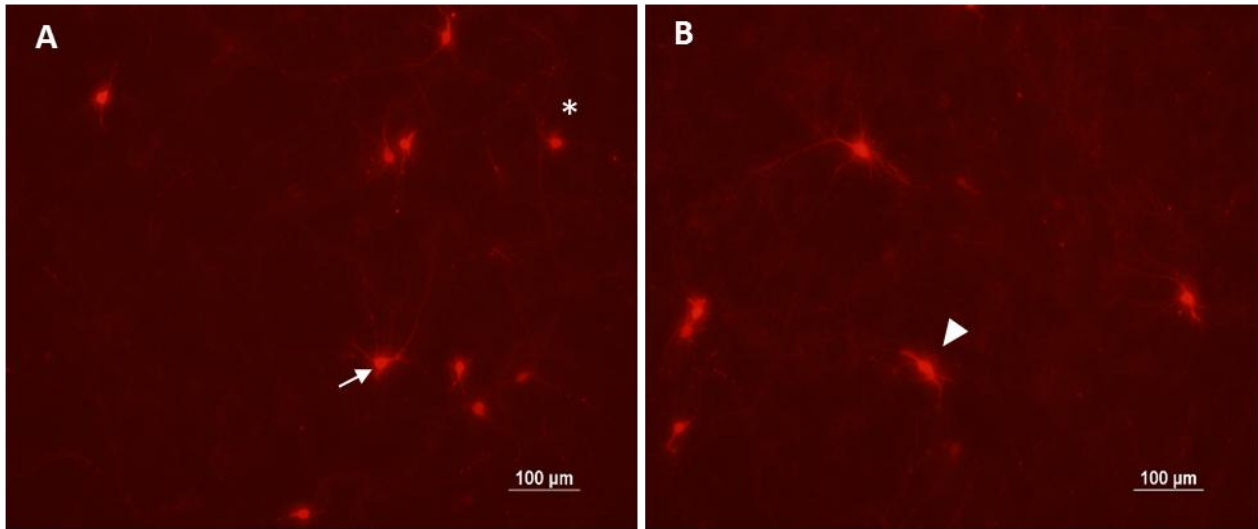


Figura 14. Fotos representativas de neuronas inmunopositivas para serotonina en cultivos de 14 DIV. A) Neuronas serotoninérgicas de somas piriformes (flecha) y redondeados (asterisco). **B)** Neuronas serotoninérgicas de somas fusiformes (punta de flecha). Fotografías realizadas en microscopio de epifluorescencia. Barra de calibración 100 µm.

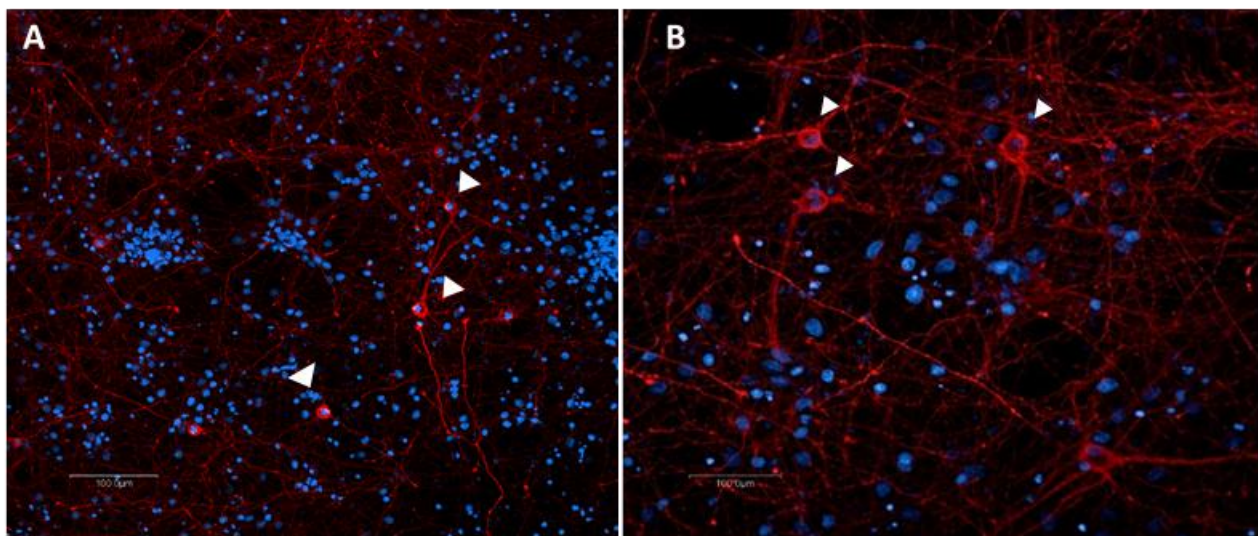


Figura 15. Fotos representativas de neuronas inmunopositivas para serotonina en cultivos de 14 DIV. A) Neuronas serotoninérgicas y su extensa red de procesos (rojo) y sus núcleos (azul). **B)** Neuronas serotoninérgicas a mayor aumento (punta de flecha). Fotografías realizadas en microscopio confocal. Barra de calibración 100 µm.

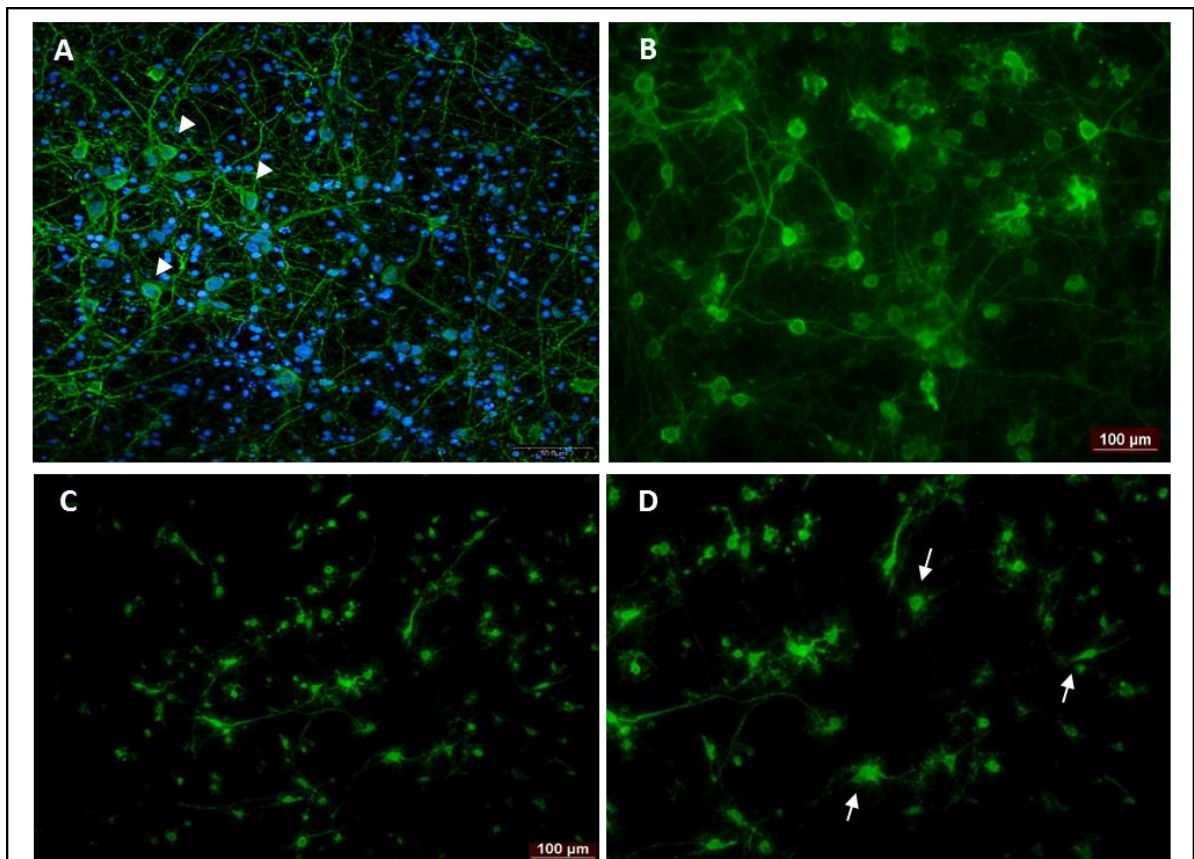


Figura 16. Fotos representativas de neuronas inmunopositivas para GABA en cultivos de 14 DIV. A) Neuronas GABA positivas (verde) y sus núcleos (azul). Las puntas de flecha indican somas GABA positivos. Fotografía realizada en microscopía confocal. B y C) Neuronas GABA positivas en microscopía de epifluorescencia. D) Neuronas GABA positivas a mayor aumento. Las flechas indican neuronas GABA positivas de diferente morfología. Barra de calibración 100 μm .

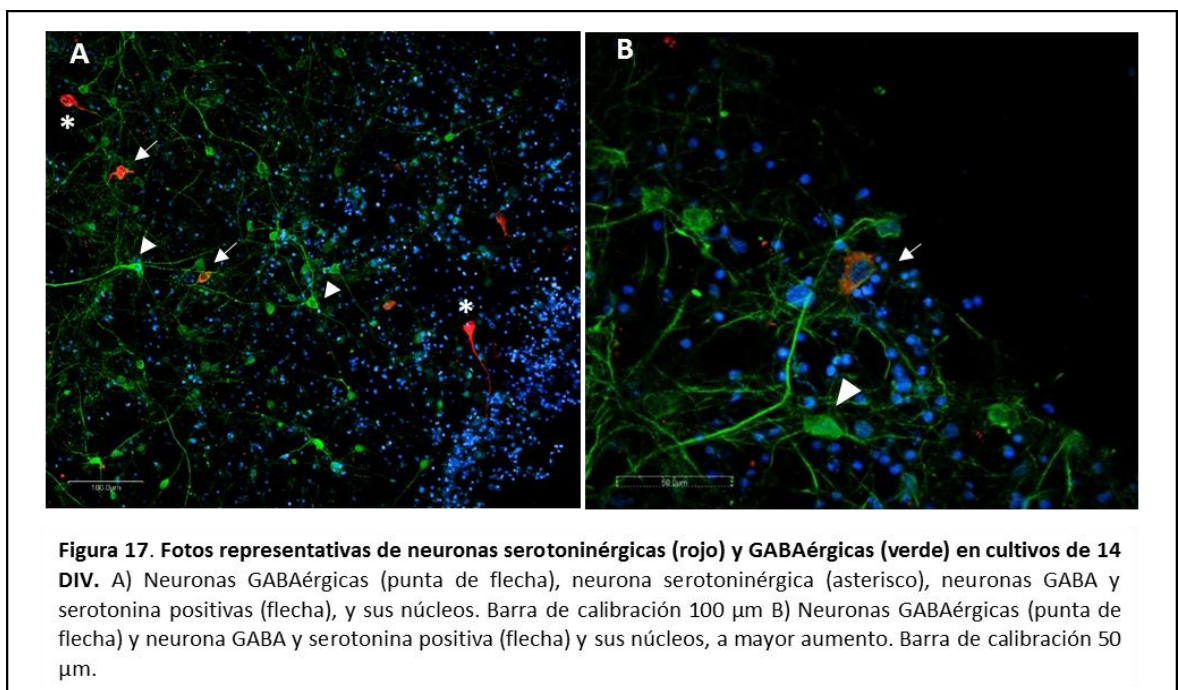


Figura 17. Fotos representativas de neuronas serotoninérgicas (rojo) y GABAérgicas (verde) en cultivos de 14 DIV. A) Neuronas GABAérgicas (punta de flecha), neurona serotoninérgica (asterisco), neuronas GABA y serotonina positivas (flecha), y sus núcleos. Barra de calibración 100 μm B) Neuronas GABAérgicas (punta de flecha) y neurona GABA y serotonina positiva (flecha) y sus núcleos, a mayor aumento. Barra de calibración 50 μm .

3. Caracterización funcional del cultivo primario de romboencéfalo.

3a. Cuantificación de los niveles de serotonina y 5-HIAA.

3a.1. Niveles basales extracelulares y celulares de serotonina y 5HIAA.

Para realizar la caracterización funcional de las neuronas serotoninérgicas, en primera instancia, se determinaron los niveles basales extracelulares e celulares de serotonina y 5HIAA a los 14 DIV. Los niveles basales extracelulares de serotonina fueron 40 veces inferiores a los correspondientes niveles de 5-HIAA (tabla 4). En cambio, los niveles basales intracelulares de serotonina fueron aproximadamente 5 veces superiores a los niveles basales celulares de 5-HIAA (Tabla 4).

Tabla 4. Niveles basales extracelulares y celulares de 5HT y 5HIAA.

Niveles basales	5HT (ng/ μ l)	5HIAA (ng/ μ l)
Extracelulares	0,011 \pm 0,005	0,44 \pm 0,23
Intracelulares	0,103 \pm 0,009	0,020 \pm 0,006

3b. Modulación de las neuronas serotoninérgicas mediante diferentes tratamientos farmacológicos.

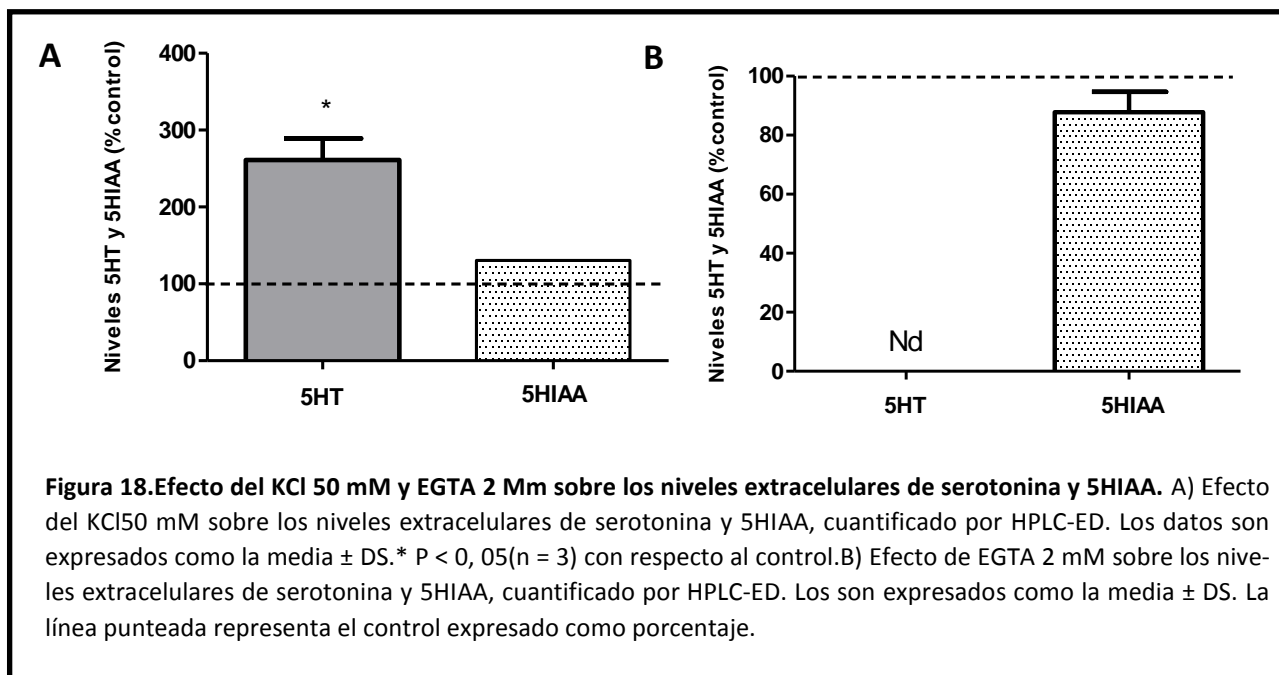
3b.1. Efecto del KCl y EGTA en los niveles extracelulares de serotonina y 5HIAA.

Para continuar con la caracterización funcional, determinamos el efecto del tratamiento con KCl y EGTA sobre los niveles extracelulares de serotonina y 5-HIAA.

La despolarización inducida mediante el tratamiento con KCl 50 mM durante 30 minutos produjo un aumento significativo en los niveles de serotonina. Este aumento fue de 2,6 veces en relación a los valores control (261,3 \pm 48,1%). En cambio los niveles de 5HIAA no presentaron cambios significativos (113,1 \pm 17,3 %) (figura 18 A).

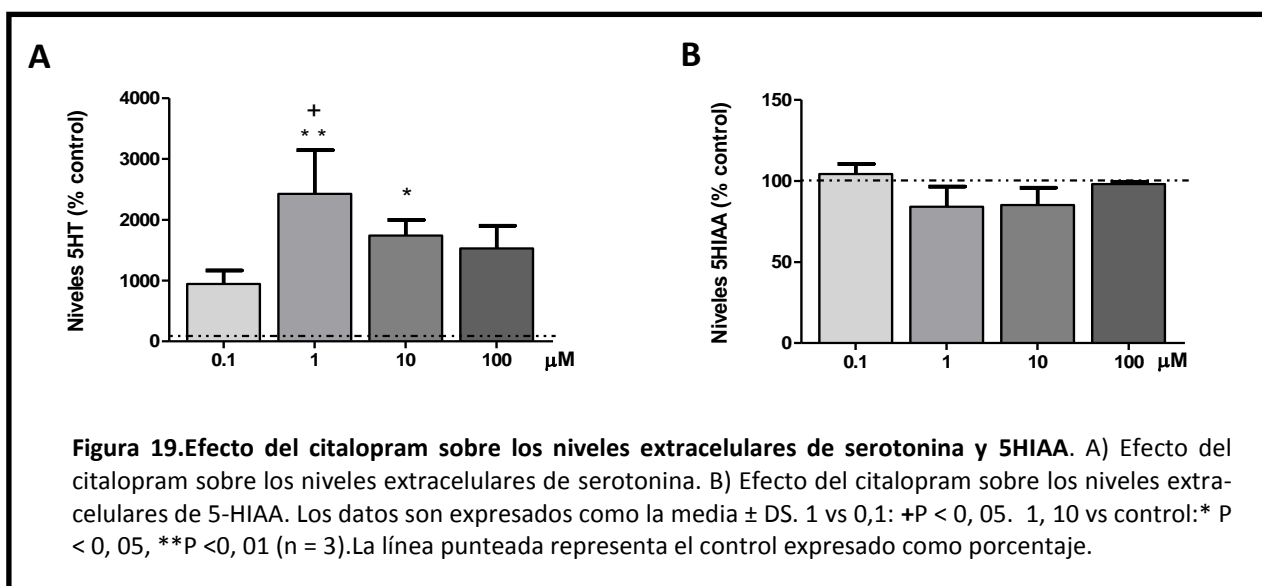
Para determinar si la liberación de serotonina en las neuronas en cultivo era dependiente de calcio, realizamos el tratamiento con el quelante de calcio EGTA a una dosis de 2 mM durante 30 minutos. Los resultados mostraron que el EGTA provocó una disminución de los niveles de serotonina en relación al control, ya que en dos de las tres muestras dichos niveles estuvieron por debajo del límite de detección del HPLC-ED y en la otra estuvo por debajo de los valores control. En cambio, los niveles de

5HIAA no mostraron cambios significativos con respecto a los valores control ($87,8 \pm 11,9 \%$) (figura 18 B).



3b.2. Efecto del citalopram en los niveles extracelulares y celulares de serotonina y 5HIAA.

Los niveles de serotonina extracelulares luego del tratamiento agudo (30 minutos) con citalopram, un ISRS típico, 1 y 10 μM , mostraron un aumento significativo con respecto a los niveles basales. La dosis de 1 μM fue la que mostró el mayor aumento ($2427,3 \pm 1248,5 \%$), en cambio las dosis de 0,1 y 100 μM no mostraron un aumento significativo con respecto al control (figura 19 A). Los niveles de 5-HIAA extracelulares mostraron una leve tendencia (no significativa) a disminuir a las dosis de 1 y 10 μM de citalopram (Figura 19 B).



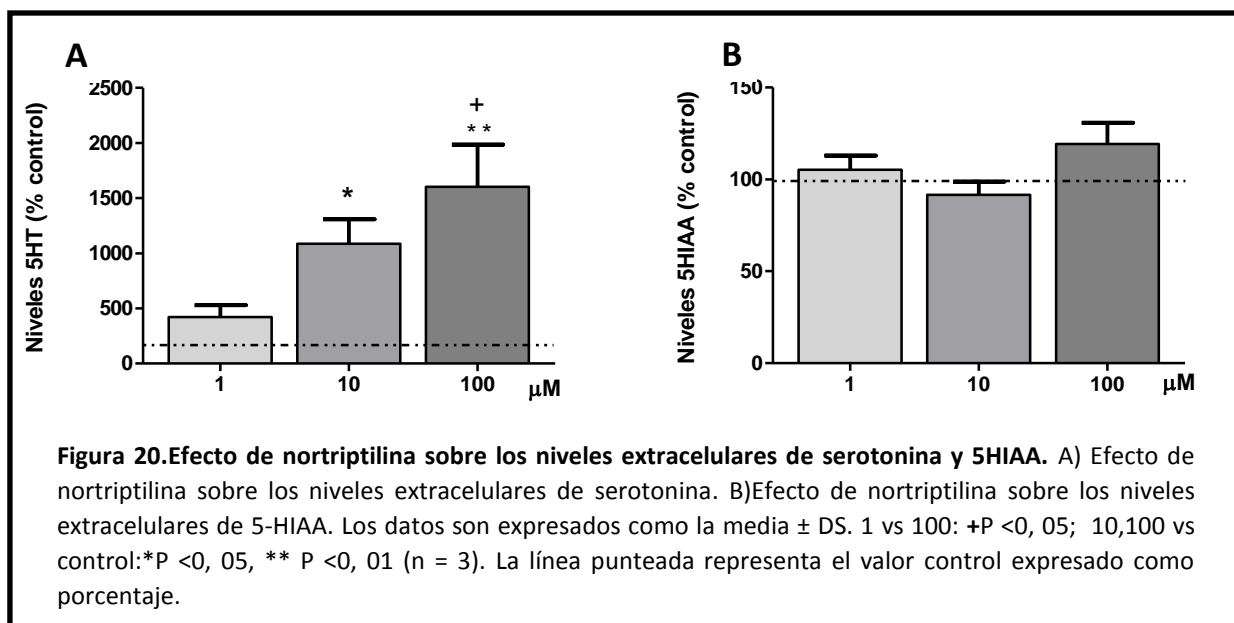
En 4 cultivos se cuantificaron también los niveles celulares de serotonina y 5HIAA luego del tratamiento con citalopram 0,1, 1, 10 y 100 μM . Los niveles celulares de serotonina y 5-HIAA para todas las dosis ensayadas de citalopram, no mostraron cambios significativos con respecto a los niveles basales. La relación entre el porcentaje de aumento de la serotonina extracelular y celular, aumentó con las dosis más bajas de citalopram (0,1 μM) hasta la concentración de 10 μM . La dosis de 100 μM de citalopram ya no ejerce una acción significativa (tabla5). En cuanto al 5-HIAA, la tabla muestra que no se producen variaciones significativas en la relación de su concentración extracelular y celular, ante las distintas dosis de citalopram ensayadas (tabla 5).

Tabla5. Relación entre los niveles extracelulares y celulares de serotonina y 5-HIAA luego del tratamiento con citalopram.

Dosis de citalopram (μM)	Relación niveles extracel/cel 5-HT	Relación niveles extracel/cel 5- HIAA
0,1	8,47	0,99
1	15,81	0,89
10	19,48	1,02
100	19,24	0,84

3b.3. Efecto de Nortriptilina en los niveles extracelulares de serotonina y 5HIAA.

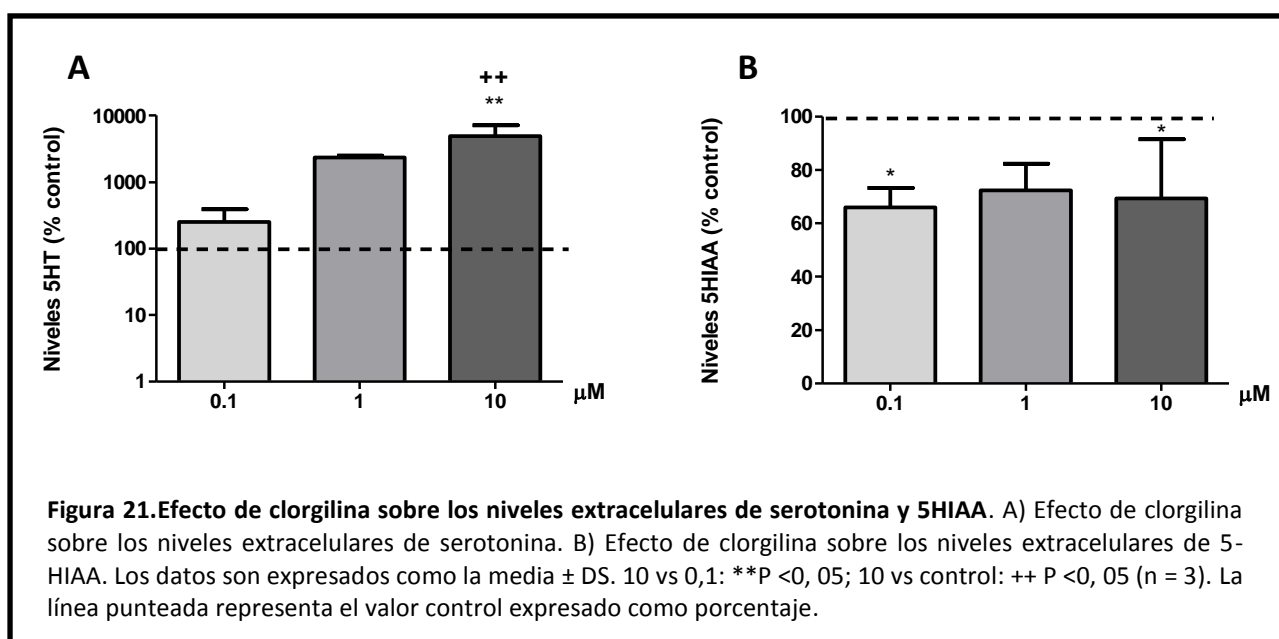
A diferencia de lo observado luego del tratamiento con citalopram, el tratamiento con nortriptilina, un inhibidor no selectivo de la recaptación de serotonina, a las dosis 1 y 10 μM no produjeron cambios significativos en los niveles de serotonina extracelulares cuantificados. Sin embargo la dosis de 100 μM mostró un aumento significativo en dichos niveles con respecto a los niveles basales (1601,3 \pm 659,1 %). Así mismo, los niveles de 5-HIAA no mostraron cambios significativos con respecto al control ante las diferentes concentraciones ensayadas (Figura20).



3.4.b. Efecto de clorgilina sobre los niveles extracelulares de serotonina y 5HIAA.

Los niveles extracelulares de serotonina, luego del tratamiento con clorgilina, un inhibidor de la MAO A, a las dosis de 0,1 y 1 μM no mostraron cambios significativos con respecto a los valores control, aunque con ambas dosis se observó una tendencia al aumento. En cambio, luego del tratamiento con clorgilina 10 μM los niveles extracelulares de serotonina mostraron un aumento significativo (4902,1 ± 2269,0 %).

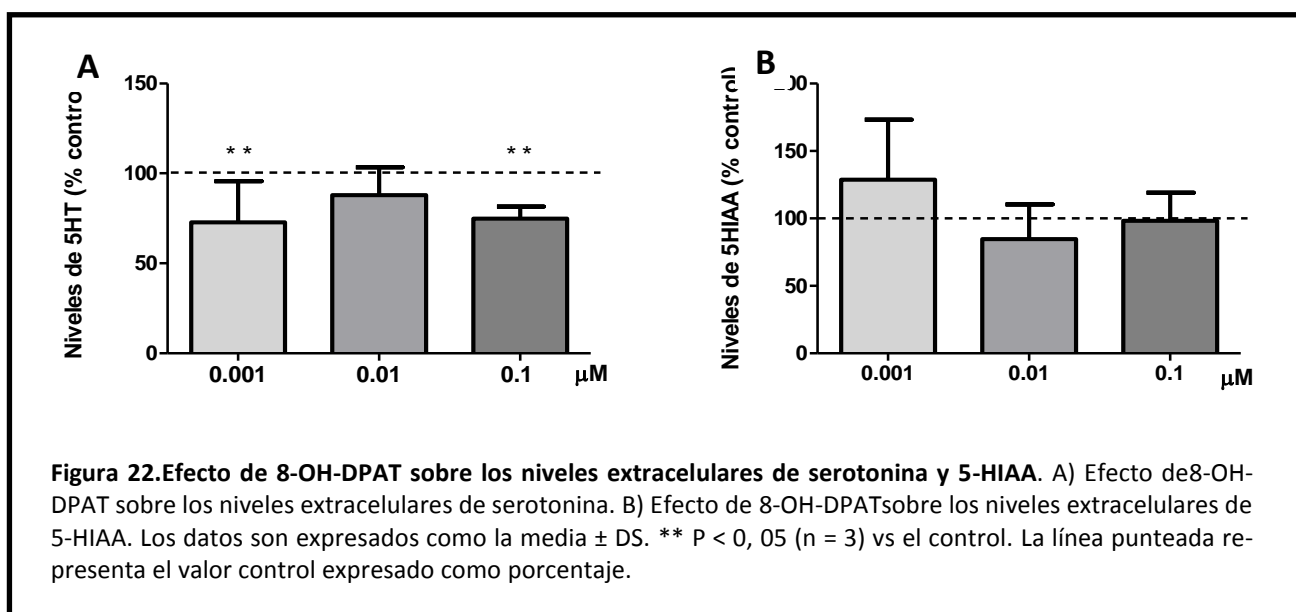
Los niveles de 5-HIAA mostraron una disminución significativa a la dosis de 0,1 y 10 μM de clorgilina (Figura 21).



3.5.b.Efecto de 8-OH-DPAT sobre los niveles extracelulares de serotonina y 5HIAA.

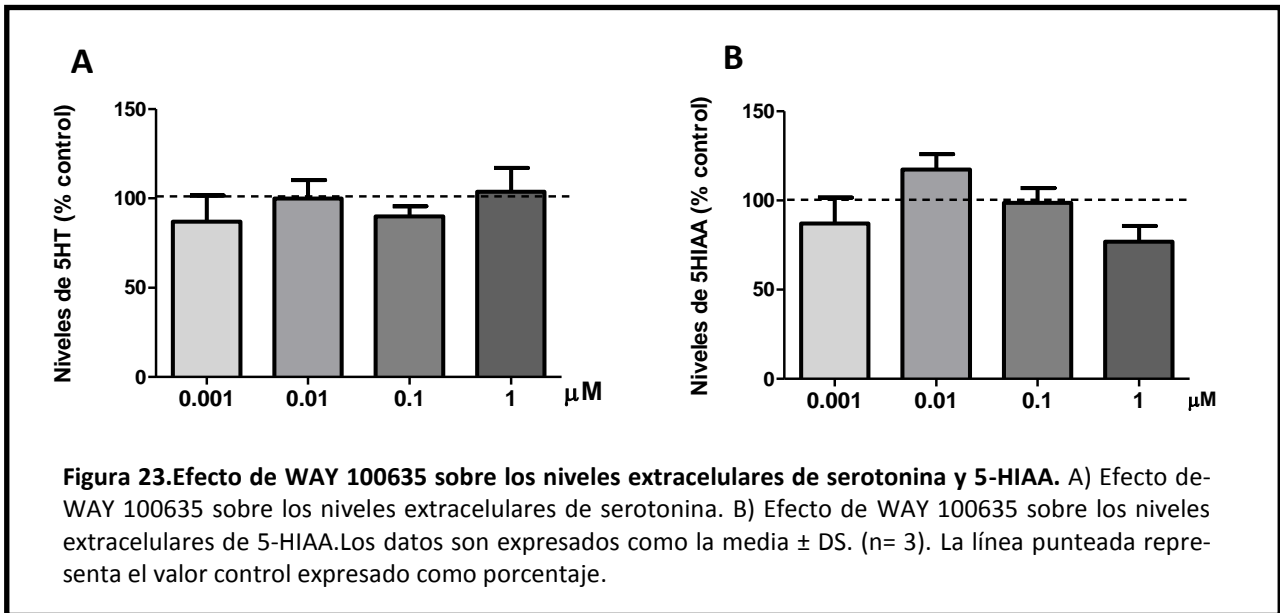
Luego del tratamiento con 8-OH-DPAT, agonista de los receptores 5-HT_{1A}, los niveles extracelulares de serotonina mostraron una disminución significativa a las concentraciones de 0,001 y 0,1 μM ($72,6 \pm 22,9\%$ y $74,8 \pm 2,1\%$, respectivamente). En cambio los niveles extracelulares de 5-HIAA no mostraron cambios significativos con respecto a los valores control a ninguna de las dosis ensayadas.

Sin embargo, con la dosis de 0,001 μM se observa una clara tendencia al aumento de los niveles de 5-HIAA ($128,68 \pm 44,6\%$) (Figura 22).



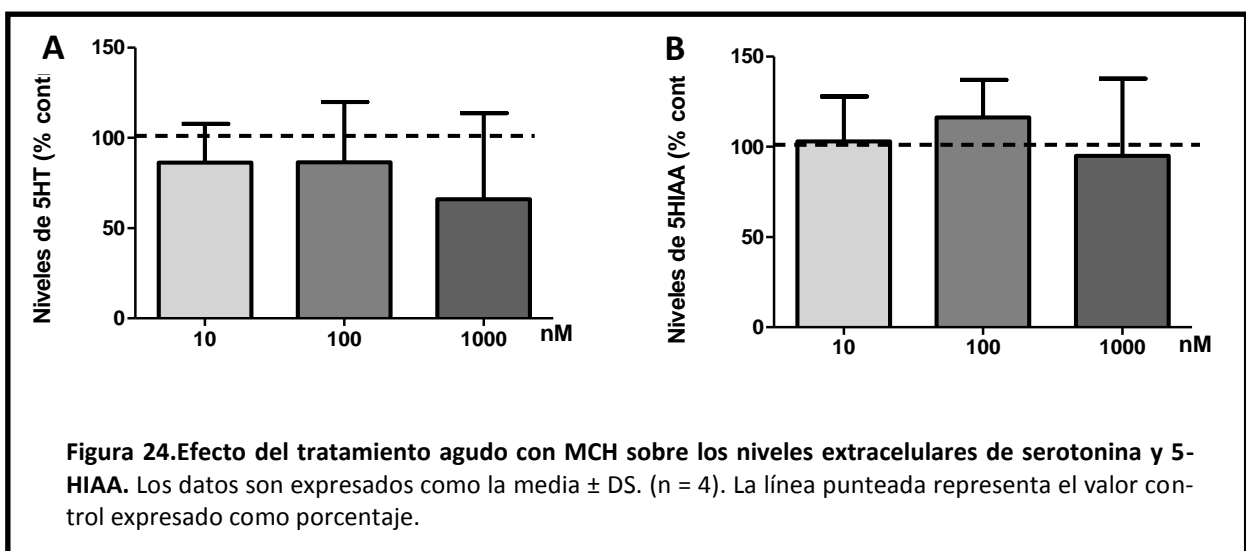
3.6.b.Efecto de WAY 10035 sobre los niveles extracelulares de serotonina y 5HIAA.

Los niveles extracelulares de serotonina y 5-HIAA luego del tratamiento con WAY 10035, antagonista de los receptores 5-HT_{1A}, no mostraron ningún cambio significativo con respecto a los valores control, a todas las dosis ensayadas (Figura 23).



4. Cuantificación de los niveles de serotonina y 5-HIAA luego del tratamiento agudo con MCH.

Los niveles extracelulares de serotonina luego del tratamiento agudo con MCH no mostraron cambios significativos con respecto a los valores control, aunque parecería observarse una leve tendencia a la disminución de los niveles de serotonina, que no resultó significativa debido al alto grado de variabilidad de los datos a todas las dosis ensayadas (Figura 24 A). Así también, no se observaron modificaciones en los niveles extracelulares de 5-HIAA a las tres dosis ensayadas de MCH (figura 24 B).



Discusión.

1. Identificación de neuronas serotoninérgicas y fibras MCHérgicas en embriones de rata en E14.

Nuestros resultados mostraron la localización de las neuronas serotoninérgicas en el embrión de rata E14 y su morfología. Además pudieron observarse fibras que formaron haces que se proyectaron a través de la curvatura mesencefálica. Asimismo, somas y procesos SERT positivos se hicieron evidentes en este estadio. Las fibras SERT positivas se localizaron en el romboencéfalo desde la zona rostral hasta la caudal, y se extendieron hacia la médula espinal. Dichos resultados, se encuentran en línea con diversos estudios inmunocitoquímicos donde se detectó y describió la localización de neuronas serotoninérgicas en el cerebro en desarrollo de embriones de rata, desde el primer estadio en el cual pueden ser identificadas hasta los estadios más avanzados de desarrollo (J. a Wallace & Lauder 1983; Lidov & Molliver 1982). En cuanto a la detección de SERT, nuestros resultados también se encuentran de acuerdo a trabajos previos. Zhou et al. 2000, detectaron la presencia de SERT en un pequeño grupo de neuronas en el romboencéfalo rostral ya desde el estadio E12 en ratas. En E14, describen a las fibras SERT positivas organizadas en haces, dejando el suelo del tubo neuronal, proyectándose rostralmente en el mesencéfalo y delineando toda la longitud de las fibras desde el área del cuerpo de la célula hasta las puntas de crecimiento (Zhou et al. 2000).

Nuestros resultados siguen la línea de los trabajos de Brischoux et al. (2001) y Risold et al. (2009), donde se describe la presencia de fibras MCHérgicas en embriones de rata en E13 y la existencia de fibras MCHérgicas orientadas caudalmente en el mesencéfalo de embriones de rata en E14 (Brischoux et al. 2001; Risold et al. 2009). Sin embargo estos trabajos, solamente describen su presencia pero no presentan ninguna imagen donde puedan observarse las fibras MCHérgicas en dichos embriones.

Las evidencias morfológicas y anatómicas con las que pudimos contrastar nuestros resultados, fueron de trabajos realizados en embriones de ratón. Nuestros resultados están de acuerdo con los trabajos de Croizier et al, (2011), (2015), en embriones de ratones MCH-GFP en E14, que describen a los axones MCHérgicos dirigiéndose caudalmente, y arqueándose en el mesencéfalo. Además muestran cómo estos se extienden hacia el tronco cerebral para llegar a la médula espinal (Croizier et al. 2011; Croizier et al. 2015).

Por otra parte, es importante resaltar que en nuestros resultados, en los cortes sagitales enteros de los embriones en E14, se observan a las fibras MCHérgicas llegando a la zona del romboencéfalo rostral donde se localizan las neuronas serotoninérgicas estudiadas.

2. Caracterización fenotípica del cultivo primario de romboencéfalo.

2.1. Neuronas serotoninérgicas.

Nuestros resultados fueron inferiores a los reportados previamente por Lautenschlager et al. 2000, quienes obtuvieron un 4% a los 14 DIV (Lautenschlager et al. 2000). Por tanto dado el bajo porcentaje de neuronas serotoninérgicas presentes en nuestros cultivos, no podemos decir que sean cultivos enriquecidos en neuronas serotoninérgicas.

En relación a este menor porcentaje de neuronas serotoninérgicas obtenidas en nuestras condiciones, podemos sugerir como causas principales, la utilización de una cepa de animales diferente, la precisión en la disección del romboencéfalo a partir del cual se obtuvieron las neuronas, diferencias en el tiempo de manipulación de los embriones durante dicha disección y en las condiciones generales del cultivo. En el trabajo de Lautenschlager et al. (2000), se utilizaron ratas Wistar, el tejido disecado se incubó en tripsina/EDTA durante 15 min 37°C, y el número de células sembradas en cada pocillo, fue de 85.000 células por cm², mientras nuestros cultivos fueron sembrados con 600.000 células por cm². Otros trabajos han utilizado diferentes cantidades de neuronas sembradas, desde 85.000 células por cm² hasta 5x10⁶ células por cm² (Birthelmer et al. 2006).

Sin embargo, a pesar del bajo número de neuronas serotoninérgicas del preparado, estas presentaron una entramada red de neuritas que cubrían gran parte del cultivo (figura 14). Y una respuesta acorde a las manipulaciones farmacológicas.

2.2. Otros fenotipos celulares.

El porcentaje de neuronas GABAérgicas presentes en nuestros cultivos, es similar al obtenido por Czesak et al. (2007), quienes reportaron un 54% de neuronas GABAérgicas, pero en cultivos de 7 DIV, y también al obtenido por Yamamoto et al. (1981), quienes reportaron un 40% de neuronas GABAérgicas en cultivos de 14 DIV.

De forma interesante, se observó que del total de neuronas GABAérgicas detectadas, el 4,6 ± 2,7 % también se encontraban inmunomarcadas para serotonina. Estos datos están en concordancia con estudios previos que han determinado que las neuronas GABAérgicas y serotoninérgicas presentes en los núcleos del rafe, comparten ciertas características farmacológicas y morfológicas, por lo que se ha

postulado que GABA y serotonina podrían ambos estar presentes co-localizando en neuronas individuales (Belin et al. 1980; Belin et al. 1983). Harandi et al. (1987), confirmaron, en ratas adultas, a través de microscopía electrónica, la coexistencia tanto de GABA como de serotonina en las mismas neuronas y sugirieron que la presencia de mecanismos de captación tanto de GABA como de serotonina podrían indicar además la acción de ambos neurotransmisores en la misma neurona (Harandi et al. 1987). Más recientemente, Shikanai et al. (2012), caracterizaron las propiedades funcionales de las neuronas serotoninérgicas que expresan GAD67 (neuronas 5-HT/GAD67) en el NDR de ratas adultas y las compararon con la de las neuronas que expresan serotonina (neuronas 5-HT) o GAD67 solo. Mientras que las neuronas 5-HT/GAD67 estaban ausentes en las partes dorsomedial o ventromedial del NDR, se distribuyeron selectivamente en el ala lateral del NDR, constituyendo el 12 % del total de neuronas de dicho núcleo. Dicha población neuronal única presentó distintas propiedades neuroquímicas y electrofisiológicas, como una menor resistencia de entrada y frecuencia de disparo que las neuronas 5-HT y la expresión del subtipo de transportador de GABA, GAT-1 (de sus siglas en inglés: GABA transporter 1), que se localiza preferentemente en las neuronas GABAérgicas. Además, en ninguna de las neuronas 5-HT/GAD67 se detectó la presencia del ARNm del inhibidor del transportador vesicular de aminoácidos (VIAAT) (de sus siglas en inglés: vesicular inhibitory amino acid transporter) (Shikanai et al. 2012).

En cuanto a resultados obtenidos en cultivos primarios, Czesak et al., 2007 detectaron neuronas serotoninérgicas que expresaban GAD (Belin et al., 1983; Nanopoulos et al., 1982), la subunidad del receptor GABA-R1 (Abellan et al., 2000) y el transportador de glutamato vesicular tipo 3 (vGLUT3) (Stornetta et al. al., 2005), lo que sugiere que algunas de las neuronas serotoninérgicas en cultivos de rafe rostral pueden producir GABA o glutamato (Czesak et al. 2007).

Por otra parte, Belin et al., 1991, reportaron en cultivos disociados de metencéfalo de embriones de rata E18, a través de la combinación de autoradiografía e inmunocitoquímica la existencia de neuronas donde la serotonina y GABA coexisten (Belin et al. 1991). Sin embargo, dicho trabajo no realiza una cuantificación de las mismas, por lo que sólo disponemos del porcentaje reportado en ratas adultas (Shikanai et al. 2012).

A diferencia de evidencias previas publicadas, en nuestros cultivos no obtuvimos neuronas TH positivas ni astrocitos. Czesak et al. 2007, reportaron la presencia de 1% de neuronas TH positivas y 5% de astrocitos en cultivos realizados a partir de hembras de la cepa Sprague-Dawley. Lautenschlager et al. 2000 detectaron la presencia de astrocitos mediante inmunohistoquímica acoplada a peroxidasa con

anticuerpos contra GFAP. En dichas condiciones, el porcentaje de astroglia fue del 9% en cultivos de 6 DIV, permaneciendo constante cuando se volvió a contar a los 10 DIV de cultivos realizados a partir de embriones de hembras de la cepa Wistar (Lautenschlager et al. 2000). La ausencia de estas células nerviosas en nuestros cultivos podrían deberse a diferencias en la precisión de la disección y diferencias en las condiciones en las que fueron realizados los cultivos.

A pesar de que nuestros resultados no muestran la presencia de células TH positivas, trabajos previos como los de Czesak et al. (2007), detectaron menos de un 1% de dichas células, por tanto, nuestros resultados no se encuentran demasiado alejados de dicho trabajo. Asimismo, la ausencia de células TH positivas probablemente se deba a diferencias mínimas en la disección, ya que las neuronas dopaminérgicas (TH positivas) se localizan adyacentes a las neuronas serotoninérgicas tanto en el romboencéfalo rostral como caudal y las neuronas adrenérgicas en la zona caudal (Dahlstrom & Fuxe, 1964; Hokfelt et al., 1984; König et al. 1988).

En cuanto a la ausencia de astrocitos, nuestros resultados están de acuerdo con trabajos previos que reportaron que la proliferación glial es suprimida bajo condiciones de cultivo en un medio libre de suero y con medio B27/Neurobasal (Brewer et al. 1993), condiciones bajo las cuales se realizaron nuestros cultivos. Asimismo, Beyer et al. (1990), mostraron que en cultivos de diencéfalo, romboencéfalo y mesencéfalo de embriones E14 de rata, existen diferencias considerables con respecto a la maduración glial en términos de contenido de GFAP. Mientras que los cultivos romboencefálicos y diencefálicos exhibieron un rápido aumento de GFAP durante el período de cultivo, los niveles de GFAP en los cultivos mesencefálicos se mantuvieron bajos (Beyer et al. 1990). Y como Brewer et al. (1993), el número de células que expresaron GFAP mostraron variaciones de acuerdo a la utilización de medio libre de suero o con suero, siendo el número de células positivas para GFAP considerablemente más bajas en cultivos libres de suero (Beyer et al. 1990).

Por tanto, nuestros resultados muestran que los cultivos primarios de romboencéfalo de embriones de rata en E14, presentaron un 2,2 % de neuronas serotoninérgicas, $56,7 \pm 7,6$ % de neuronas GABAérgicas, de las cuales un $4,6 \pm 2,7$ % evidenciaron inmunoreactividad tanto para GABA como para serotonina. Dichos resultados conforman aproximadamente el 60 % del total de células presentes en nuestros cultivos. Czesak et al. (2007), también obtuvieron un porcentaje de células serotoninérgicas y GABAérgicas cercano al 60 % de las células totales en cultivos de romboencéfalo y, determinaron mediante la tinción con Tuj1 y NeuN que el resto de las células presentes eran predominantemente tipos de células neuronales (Czesak et al. 2007), aunque no profundizaron en su caracterización.

3. Caracterización funcional del cultivo primario de romboencéfalo.

3a. Cuantificación de los niveles basales extracelulares y celulares de serotonina y 5-HIAA.

En la literatura pueden encontrarse diferentes trabajos que han empleado precursores radiomarcados para poder medir tanto la síntesis como la liberación de neurotransmisores en cultivos primarios de romboencéfalo, incluyendo la serotonina. Los precursores radiomarcados minimizan el principal problema, que es el bajo número de las células serotoninérgicas presentes en los cultivos, que tiene como consecuencia bajas cantidades de neurotransmisores y sus metabolitos y por tanto, la dificultad de su detección (Paolillo et al. 1993). En nuestro modelo y con nuestras condiciones experimentales, pudimos detectar y cuantificar los niveles basales endógenos de serotonina tanto en las células como en el medio extracelular, así como también los de su principal metabolito, el 5HIAA. Es así que nuestro sistema tiene la gran ventaja de poder determinar el funcionamiento fisiológico de estas células en cultivo sin la necesidad de agregar precursores radioactivos o drogas para poder detectar los niveles basales.

La presencia de niveles cuantificables de serotonina y 5-HIAA basales extracelulares en un rango detectable por nuestro sistema de HPLC-DE, mostró el correcto funcionamiento de las neuronas serotoninérgicas cultivadas y la efectividad del sistema de detección.

Es interesante resaltar que, a pesar de la baja proporción de neuronas serotoninérgicas (2,2%, n= 30 cultivos) en relación al total de células vivas contabilizadas en nuestros cultivos ($n=1380 \pm 608$), estas neuronas crecieron en un ambiente óptimo para el funcionamiento de su maquinaria biosintética, de liberación y degradación, lo cual fue puesto en evidencia a través de la cuantificación de los niveles basales endógenos de serotonina y 5-HIAA tanto en las muestras de células como de medio extracelular. Por otra parte, y en la misma línea de análisis, a pesar de la baja densidad de neuronas serotoninérgicas obtenidas, se pudieron detectar y cuantificar niveles de serotonina y su principal metabolito con nuestro sistema de detección analítico (por encima de los límites de detección), lo cual lo convierte en una herramienta óptima para estudiar la modulación de este sistema sin la necesidad de precursores radiomarcados y las consiguientes dificultades que conlleva su utilización.

3b. Modulación de las neuronas serotoninérgicas en cultivo mediante diferentes tratamientos farmacológicos.

3b.1. Efecto de KCl en los niveles extracelulares de serotonina y 5HIAA.

La despolarización de las neuronas serotoninérgicas producida por el tratamiento con KCl 50 mM durante 30 minutos produjo un aumento significativo de 2,6 veces en los niveles de serotonina en el medio extracelular ($261,3 \pm 48,1$ %). En cambio, los niveles de 5HIAA no presentaron cambios significativos con respecto a los controles ($113,1 \pm 17,3$ %). Este aumento de los niveles de serotonina luego del tratamiento con KCl es lo esperado y está de acuerdo con trabajos previos en cultivos de romboencéfalo (Lautenschlager et al. 2000). Dichos autores observaron que al elevar la concentración de K^+ a 50 mM durante 5 minutos a $37^\circ C$, la liberación de serotonina aumentó en una proporción de aproximadamente 2,7 veces con respecto a los niveles control. En la misma línea de resultados, Yamamoto et al. (1981), observaron un aumento de 2,5 veces en la liberación de serotonina de cultivos de romboencéfalo de embriones de rata en E13-E14 (14 DIV) luego de la incubación en una solución con K^+ (44 mM) durante 5 minutos (Yamamoto et al. 1981).

3b.2. Efecto de EGTA sobre los niveles extracelulares de serotonina y 5-HIAA.

El tratamiento con el quelante de calcio EGTA a una dosis de 2 mM durante 30 minutos, provocó una disminución significativa de los niveles de serotonina en relación al control. Por tanto, podemos concluir que una gran proporción de la serotonina liberada al medio extracelular por las neuronas serotoninérgicas en cultivo, en estas condiciones, es calcio dependiente.

A pesar de haber obtenido el resultado antes mencionado, no se puede descartar la existencia de liberación de serotonina calcio-independiente, como muestran otros trabajos (Mlinar et al. 2015; Adell 2015), fundamentalmente en relación a la liberación basal de serotonina endógena. Mlinar et al. 2015, evidenciaron la liberación de serotonina no-excitotóxica basal, utilizando un enfoque electrofisiológico en una preparación de rebanadas de rafe obtenidas de cerebro de ratones knockout para la enzima triptófano hidroxilasa-2 (Tph2). Las rebanadas fueron incubadas en una solución de perfusión carente de Ca^{2++} o mediante la adición de Cd^{2++} , el cual impide la entrada de Ca^{2++} a través de los canales de calcio voltaje-dependientes, y conteniendo inhibidores de la actividad de disparo.

En cambio, en cuanto al metabolito de la serotonina, el 5-HIAA, como era esperable dada la naturaleza de su liberación (difusión simple a través de la membrana de las neuronas), los niveles extracelulares

de 5HIAA ante el tratamiento con EGTA no mostraron modificaciones con respecto a los valores control ($87,8 \pm 11,9 \%$).

3b.3.Efecto del citalopram en los niveles extracelulares y celulares de serotonina y 5HIAA.

La curva-dosis respuesta del efecto del citalopram sobre la concentración de serotonina extracelular cuantificada en nuestros cultivos tuvo un perfil de tipo campana, y el máximo efecto se observó a la concentración de $1 \mu\text{M}$. Las posibles explicaciones a dicho resultado incluyen la autorregulación de las neuronas serotoninérgicas por la activación de los autorreceptores 5-HT₁ (que inhiben su liberación) o efectos no específicos de las concentraciones más altas de citalopram ($100 \mu\text{M}$). Dichos efectos ya fueron reportados por Nagayasu et al.(2010), en cultivos organotípicos de rafe bajo la exposición sostenida durante 4 días con citalopram ($0,1-10 \text{ mM}$)(Nagayasu et al. 2010).

Por otra parte, los niveles extracelulares de 5-HIAA bajo el efecto del citalopram, no mostraron variaciones significativas con respecto al control. Sin embargo, pudo observarse una tendencia a la disminución para las dosis de 1 y $10 \mu\text{M}$. A pesar de que estos resultados no son significativos, dicha leve tendencia, se encuentran de acuerdo a lo esperado, dado que si se inhiben los SERT, disminuye la serotonina recaptada y por lo tanto, debería disminuir la serotonina metabolizada a 5-HIAA. En el trabajo de Héry et al. (2000), cuyo objetivo fue determinar y comparar las funciones de serotonina en la regulación de la unión de los receptores de glucocorticoides en los núcleos del rafe y en el hipocampo, realizaron cultivos de rafe de embriones de rata en E14. Para verificar que en sus condiciones experimentales pargilina y citalopram producían un aumento en los niveles extracelulares de serotonina, estos autores cuantificaron los niveles de serotonina y 5-HIAA en el medio luego de 30, 60 y 120 minutos de tratamientos con dichos fármacos. Observaron que el efecto máximo de pargilina se observó después de 120 minutos, con un 380% de aumento en los niveles de serotonina y una disminución del 70% en los niveles de 5-HIAA, y que luego del tratamiento con citalopram, los niveles de serotonina aumentaron en 150% a los 30 min y alcanzaron su máximo en 120 min (428%), mientras que los niveles de 5-HIAA comenzaron a disminuir significativamente recién a los 120 min (Héry et al. 2000). De acuerdo a estos datos, parecería ser necesario un tiempo mínimo de 120 minutos para observar modificaciones en los niveles de 5-HIAA luego del tratamiento con citalopram, lo cual no fue realizado en nuestros experimentos.

3b.4.Efecto de Nortriptilina en los niveles extracelulares de serotonina y 5HIAA.

Los niveles de serotonina extracelulares luego del tratamiento agudo con nortriptilina $100 \mu\text{M}$ mostraron un aumento significativo con respecto a los niveles control. A diferencia de lo observado luego

del tratamiento con citalopram, las dosis de nortriptilina 1 y 10 μM no produjeron cambios significativos en los niveles de serotonina. Así mismo, los niveles de 5-HIAA no mostraron cambios significativos con respecto al control ante las diferentes concentraciones ensayadas (Figura). La nortriptilina es un conocido inhibidor del transportador de noradrenalina (NET), pero también presenta afinidad por el SERT, aunque es menor que para el NET (K_i para NET es de 3,4 nM, k_i para SERT es 161 nM (Zhou 2004). Si comparamos la K_i de la Nortriptilina por el SERT es un orden de magnitud menor que la del citalopram, lo que está de acuerdo con las concentraciones de cada droga que mostraron efecto en aumentar los niveles extracelulares de serotonina en nuestros experimentos.

3b.5. Efecto de clorgilina sobre los niveles extracelulares de serotonina y 5HIAA.

Los niveles de serotonina extracelulares luego del tratamiento agudo con el inhibidor de la MAO A, clorgilina, aumentaron significativamente con respecto a los niveles control, únicamente con 10 μM , la dosis más alta ensayada en nuestras condiciones. Nuestros resultados están de acuerdo con lo reportado por diversos trabajos que demostraron que la inhibición de la MAO A incrementa las concentraciones de serotonina en la hendidura sináptica (Sharp et al. 1997) y afecta el disparo de neuronas serotoninérgicas en el NDR (Aghajanian et al. 1970; Blier & de Montigny 1985). Se ha propuesto que la serotonina se acumularía en el citoplasma después de la inhibición de la enzima MAO A, aunque probablemente no estaría disponible para la liberación vesicular, sino que podría dejar la neurona por flujo activo o pasivo a través de la membrana (Finberg & Youdim 1983).

En cuanto a los niveles de 5-HIAA, se observó una disminución significativa para la dosis de menor y mayor concentración de clorgilina: 0,1 μM y 10 μM , respectivamente. Estos resultados se ajustan a la acción de un inhibidor de la enzima MAO A, esto es, impedir la degradación de serotonina, y por ende, la consiguiente disminución del producto de degradación, el 5-HIAA.

3b.6. Efecto de 8-OH-DPAT sobre los niveles extracelulares de serotonina y 5HIAA.

Los niveles extracelulares de serotonina luego del tratamiento con 8-OH-DPAT, agonista de los receptores 5-HT_{1A}, a las concentraciones de 0,001 μM y 0,1 μM mostraron una disminución significativa en comparación con los niveles control. En cambio, los niveles extracelulares de 5-HIAA no mostraron cambios significativos con respecto a los valores control. Dichos resultados están de acuerdo con trabajos anteriores realizados en cultivos primarios de rafe dorsal en E14, a pesar de que las condiciones de los cultivos difirieron, indicaron que el tratamiento con 8-OH-DPAT a las concentraciones de 0,001 μM , 0,01 μM y 0,1 μM , produjeron una disminución en los niveles de serotonina, comparados con los controles (Héry et al. 1999). Asimismo Héry et al. (1999), demostraron por primera vez a través del

tratamiento de dichos cultivos con tetrodotoxina (TTX) (compuesto que bloquea la propagación del potencial de acción desde los somas neuronales a los terminales sinápticos), que los receptores 5-HT1A están localizados en el compartimento somatodendrítico, mientras que los receptores 5-HT1B están localizados en las terminaciones nerviosas de las neuronas embrionarias, tal como se describe en el cerebro adulto (Héry et al. 1999). Por otra parte, la disminución de los niveles extracelulares de serotonina inducida por 8-OH-DPAT, debería producir una modificación en los niveles de 5HIAA, dado que habría menos serotonina para ser recaptada y degradada. Sin embargo, en nuestras condiciones, los niveles extracelulares de 5-HIAA no mostraron cambios significativos, como se comentó anteriormente podría deberse al tiempo de incubación con dicha droga.

3b.7. Efecto de WAY 10035 sobre los niveles extracelulares de serotonina y 5HIAA.

Los niveles extracelulares de serotonina y 5-HIAA luego del tratamiento con WAY 10035, antagonista de los receptores 5-HT1A, a todas las dosis ensayadas, no mostraron ningún cambio significativo con respecto a los valores control. En relación a los niveles de serotonina, nuestros resultados concuerdan con los obtenidos previamente en varios trabajos. El tratamiento de cultivos de romboencéfalo de E14-E15 con WAY-100135 0,01 μM y 1 μM , no tuvieron un efecto significativo en la liberación espontánea de serotonina según Héry et al. (1999) y BIRTHELMEL et al. (2007), respectivamente (Héry et al. 1999; BIRTHELMER et al. 2006). Los resultados antes mencionados, podrían estar de acuerdo con el trabajo de Johnson et al., 2002, que mediante registros electrofisiológicos de rodajas de NDR in vitro estudiaron la auto inhibición de los receptores 5-HT1A y determinaron que la serotonina liberada a velocidades de disparo fisiológicas, es decir, la liberación basal de serotonina endógena, no activaría a los receptores 5-HT1A (Johnson et al. 2002). Nuestros cultivos fueron tratados únicamente con WAY 100135, sin la adición de drogas que aumenten la neurotransmisión, por consiguiente la serotonina cuantificada es la serotonina basal, y según el trabajo antes mencionado, los niveles no alcanzarían a activar los receptores 5-HT1A.

4. Efecto de la MCH sobre los niveles extracelulares de serotonina y 5HIAA.

Los niveles extracelulares tanto de serotonina como de 5-HIAA luego del tratamiento agudo con MCH no mostraron cambios significativos con respecto a los valores control. Aunque se observa una leve tendencia a la disminución de los niveles de serotonina con la dosis de mayor concentración (1 μM), esta no resultó significativa debido al alto grado de variabilidad de los datos a todas las dosis ensayadas.

Según los trabajos mencionados previamente, las neuronas MCHérgicas son generadas entre los estadios E10 y E16 de la vida embrionaria de ratas, con un pico en su génesis alrededor de E13 (Brischoux et al. 2001). En E14, dichas neuronas, poseen cuerpos celulares de aspecto inmaduro, siendo de pequeño tamaño, con un núcleo voluminoso y un anillo delgado de citoplasma alrededor de él (Brischoux et al. 2001). Las neuronas MCHérgicas presentan diferencias en su génesis en función del blanco de acción de sus fibras, siendo las que proyectan hacia la médula espinal, y probablemente a sectores posteriores al hipotálamo como los núcleos del rafe, son generadas ya en estadios tempranos como E11, y como se detalló anteriormente, se describió la presencia de dichas fibras orientadas caudalmente en el mesencéfalo (Brischoux et al. 2001; Risold et al. 2009). Nuestros resultados mostraron más precisamente la presencia de fibras MCHérgicas en el romboencéfalo rostral de embriones E14.

Sin embargo, a pesar de que se observe la presencia de fibras MCHérgicas que alcanzan a la zona o a las neuronas serotoninérgicas, es posible que aún en esa etapa embrionaria, los receptores MCHR-1 no se expresen como receptores funcionales a nivel de dichas neuronas, lo cual estaría en la línea de los resultados obtenidos en este trabajo al cuantificar el efecto de la MCH en los niveles de serotonina. Diversos estudios realizados con receptores ionotrópicos y metabotrópicos, han determinado que el establecimiento de las redes neuronales comienza con axones en crecimiento que reconocen sus objetivos postsinápticos, formando así contactos sinápticos. Este proceso se puede dividir en dos fases distintas: la primera (formación de sinapsis) comprende el establecimiento de una comunicación sináptica funcional y la segunda fase (maduración de la sinapsis) comprende la diferenciación funcional y morfológica de las sinapsis; ambas fases requieren una comunicación estrecha entre elementos pre y postsinápticos. Cómo se diferencian los elementos pre y post-sinápticos específicos, cómo se generan los contactos sinápticos en el desarrollo y cómo estas sinapsis se remodelan y mantienen en el cerebro maduro parece estar en parte mediada por la acción de receptores de neurotransmisores (Luján et al. 2005). En consecuencia, según dichos estudios, en principio, si las fibras MCHérgicas alcanzan a las neuronas serotoninérgicas, los receptores estarían presentes en dichas neuronas. Asimismo, aún podría argumentarse que las sinapsis en E14 no estarían maduras, por lo que hacen falta más experimentos para determinar la funcionalidad de dichas sinapsis.

Por otra parte, no hay que perder de vista la presencia de las neuronas GABAérgicas en nuestros cultivos de romboencéfalo de embriones de rata, las cuales representan más del 50 % del total de células presentes en dichos cultivos. Diversos trabajos sugieren que la liberación de serotonina está media-

daen los cultivos de romboencéfalo por los receptores GABA_A y GABA_B (Becquet et al. 1993). Por tanto, en nuestros cultivos, GABA ejercería sus efectos sobre las neuronas serotoninérgicas a través de dichos receptores. Además, varios trabajos han determinado que el control de GABA sobre el metabolismo de serotonina es de naturaleza tónica (Becquet et al. 1993).

Por otra parte, existen evidencias de que las neuronas GABAérgicas expresan receptores para neuropéptidos en el SNC (Melander et al. 1986), por tanto, podrían expresar receptores para MCH, y de esta forma, la MCH, también podría actuar sobre las neuronas GABAérgicas, aumentando así la complejidad de las interacciones sinápticas de nuestro sistema.

Sería de gran importancia poder contar con evidencias morfológicas donde puedan observarse la presencia o ausencia de los MCHR1 en la membrana de las neuronas serotoninérgicas y/o GABAérgicas.

Conclusiones y perspectivas.

Los resultados obtenidos permiten concluir que:

- 1) El cultivo primario presentó un bajo porcentaje de neuronas serotoninérgicas, sin embargo, la respuesta funcional de las neuronas serotoninérgicas respondió de forma adecuada a los diferentes estímulos y tratamientos.
- 2) Se identificó la presencia de una gran cantidad de fibras MCHérgicas en los embriones E14 en el romboencéfalo, sin embargo la modulación de las neuronas serotoninérgicas por la MCH no respondió de la forma esperada, ya que el tratamiento de los cultivos con MCH no indujo modificaciones significativas en los niveles de serotonina, aunque se observó una tendencia a la disminución. Deben realizarse futuros experimentos para modificar las variables en el cultivo que permitan evidenciar dicha modulación:
 - Mejorar la riqueza de neuronas serotoninérgicas en nuestras condiciones de cultivo.
 - Repetir los tratamientos agudos con MCH para disminuir la variabilidad biológica observada.
 - Realizar tratamientos crónicos con MCH, para determinar si es necesario un mayor tiempo de incubación para la acción de la MCH en estas neuronas.
 - Determinar la presencia de los MCHR-1 en las neuronas serotoninérgicas y GABAérgicas, a través de inmunohistoquímica anti-MCHR1 en cortes sagitales de embriones de rata E14 y en los cultivos de romboencéfalo.
 - Realizar tratamientos con MCH y ATC-0175, antagonista específico de los MCHR-1.
 - Realizar el tratamiento con un ISRS sumado al antagonista de los MCHR-1, con el objetivo de evidenciar un efecto anti-depresivo sumado.
 - Determinar la presencia de los receptores de GABA en las neuronas serotoninérgicas a través de inmunohistoquímica anti GABA_A y GABA_B.
 - Realizar tratamientos con agonistas y antagonistas del receptor GABA_A y GABA_B, para determinar la importancia de la interacción neuronal entre las neuronas GABAérgicas y las serotoninérgicas y determinar su participación en la modulación de la liberación de serotonina.

Referencias bibliográficas.

- Abney, E.R., Bartlett, P.P. & Raff, M.C., 1981. Astrocytes, ependymal cells, and oligodendrocytes develop on schedule in dissociated cell cultures of embryonic rat brain. *Developmental biology*, 83(2), pp.301–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7239014> [Accessed September 29, 2017].
- Adell, A., Carceller, A. & Artigas, F., 1993. In vivo brain dialysis study of the somatodendritic release of serotonin in the Raphe nuclei of the rat: effects of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin. *Journal of neurochemistry*, 60(5), pp.1673–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7682600> [Accessed September 3, 2017].
- Adell, A., Casanovas, J.M. & Artigas, F., 1997. Comparative study in the rat of the actions of different types of stress on the release of 5-HT in raphe nuclei and forebrain areas. *Neuropharmacology*, 36(4–5), pp.735–741. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9225300> [Accessed September 3, 2017].
- Adell, a., 2015. Revisiting the role of raphe and serotonin in neuropsychiatric disorders. *The Journal of General Physiology*, 145(4), pp.257–259. Available at: <http://www.jgp.org/cgi/doi/10.1085/jgp.201511389>.
- Aghajanian, G.K., Graham, A.W. & Sheard, M.H., 1970. Serotonin-containing neurons in brain: depression of firing by monoamine oxidase inhibitors. *Science (New York, N.Y.)*, 169(3950), pp.1100–2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5449322> [Accessed September 14, 2017].
- Aitken, A.R. & Törk, I., 1988. Early development of serotonin-containing neurons and pathways as seen in wholemount preparations of the fetal rat brain. *The Journal of comparative neurology*, 274(1), pp.32–47. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3047187> [Accessed March 2, 2015].
- American Psychiatric Association, 2013. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, American Psychiatric Association. Available at: <http://psychiatryonline.org/doi/book/10.1176/appi.books.9780890425596> [Accessed November 3, 2017].
- Andrade, R. et al., 2015. 5-HT_{1A} Receptor-Mediated Autoinhibition and the Control of Serotonergic Cell Firing. *ACS Chemical Neuroscience*, 6(7), pp.1110–1115. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25913021> [Accessed November 3, 2017].
- Anne, C. & Gasnier, B., 2014. *Vesicular neurotransmitter transporters: Mechanistic aspects* 1st ed., Elsevier Inc. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800223-0.00003-7>.
- Arai, R. et al., 2002. Differential subcellular location of mitochondria in rat serotonergic neurons depends on the presence and the absence of monoamine oxidase type B. *Neuroscience*, 114(4), pp.825–835. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306452202003512> [Accessed December 15, 2017].
- Artigas, F. et al., 1996. Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT_{1A} antagonists. *Trends in Neurosciences*, 19(9), pp.378–383. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8873352> [Accessed September 3, 2017].
- Artigas, F. et al., 1996. Adaptive changes of the serotonergic system after antidepressant treatments. *Advances in*

experimental medicine and biology, 398, pp.51–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8906240> [Accessed September 3, 2017].

Artigas, F., 2001. Limitations to enhancing the speed of onset of antidepressants? are rapid action antidepressants possible? *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*, 16(1), pp.29–36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12404595> [Accessed September 3, 2017].

Asberg, M., Träskman, L. & Thorén, P., 1976. 5-HIAA in the cerebrospinal fluid. A biochemical suicide predictor? *Archives of general psychiatry*, 33(10), pp.1193–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/971028> [Accessed December 3, 2015].

Bach-Mizrachi, H. et al., 2006. Neuronal tryptophan hydroxylase mRNA expression in the human dorsal and median raphe nuclei: major depression and suicide. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 31(4), pp.814–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16192985> [Accessed March 2, 2015].

Baraban, J.M. & Aghajanian, G.K., 1981. Noradrenergic innervation of serotonergic neurons in the dorsal raphe: demonstration by electron microscopic autoradiography. *Brain research*, 204(1), pp.1–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6166350> [Accessed September 4, 2017].

Barnes, N.M. & Neumaier, J.F., 2011. Neuronal 5-HT Receptors and SERT. *Tocris Biosciences Scientific Review Series*, 34, pp.1–15.

Barnes, N.M. & Sharp, T., 1999. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*, 38(8), pp.1083–1152.

Bel, N. & Artigas, F., 1993. Chronic treatment with fluvoxamine increases extracellular serotonin in frontal cortex but not in raphe nuclei. *Synapse (New York, N.Y.)*, 15(3), pp.243–5. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/syn.890150310> [Accessed September 3, 2017].

Bel, N. & Artigas, F., 1992. Fluvoxamine preferentially increases extracellular 5-hydroxytryptamine in the raphe nuclei: an in vivo microdialysis study. *European journal of pharmacology*, 229(1), pp.101–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1282104> [Accessed November 12, 2015].

Belin, M.F. et al., 1983. Immunohistochemical evidence for the presence of gamma-aminobutyric acid and serotonin in one nerve cell. A study on the raphe nuclei of the rat using antibodies to glutamate decarboxylase and serotonin. *Brain research*, 275(2), pp.329–39. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6354359> [Accessed September 25, 2015].

Belin, M.F. et al., 1991. Primary Dissociated Cell-Culture of Embryonic Rat Metencephalon - Presence of Gaba in Serotonergic Neurons. *Neuroscience Letters*, 125(2), pp.101–106.

Belin, M.F. et al., 1980. Selective uptake of [3H]gamma-aminobutyrate by rat supra- and subependymal nerve fibers, histological and high resolution radioautographic studies. *Neuroscience*, 5(2), pp.241–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7374940> [Accessed September 13, 2017].

- Beyer, C. et al., 1990. Region- and sex-related differences in maturation of astrocytes in dissociated cell cultures of embryonic rat brain. *Glia*, 3(1), pp.55–64. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/glia.440030108> [Accessed November 14, 2017].
- Birthermer, A. et al., 2006. Modulation of electrically evoked serotonin release in cultured rat raphe neurons. *Journal of Neurochemistry*, 0(0), p.070209222715078–???. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17348865> [Accessed September 4, 2017].
- Bittencourt, J. & Celis, M.E., 2008. Anatomy, function and regulation of neuropeptide EI (NEI). *Peptides*, 29(8), pp.1441–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18456371> [Accessed March 2, 2015].
- Bittencourt, J.C. et al., 1992. The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *The Journal of comparative neurology*, 319(2), pp.218–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1522246> [Accessed March 2, 2015].
- Blier, P. & de Montigny, C., 1994. Current advances and trends in the treatment of depression. *Trends in pharmacological sciences*, 15(7), pp.220–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7940983> [Accessed September 3, 2017].
- Blier, P. & de Montigny, C., 1985. Serotonergic but not noradrenergic neurons in rat central nervous system adapt to long-term treatment with monoamine oxidase inhibitors. *Neuroscience*, 16(4), pp.949–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3005914> [Accessed September 14, 2017].
- Bockaert, J. et al., 2006. Neuronal 5-HT metabotropic receptors: fine-tuning of their structure, signaling, and roles in synaptic modulation. *Cell and tissue research*, 326(2), pp.553–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16896947> [Accessed September 28, 2015].
- Van Bockstaele, E.J., Cestari, D.M. & Pickel, V.M., 1994. Synaptic structure and connectivity of serotonin terminals in the ventral tegmental area: potential sites for modulation of mesolimbic dopamine neurons. *Brain research*, 647(2), pp.307–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7522922> [Accessed September 4, 2017].
- Borowsky, B. et al., 2002. Antidepressant, anxiolytic and anorectic effects of a melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonist. *Nature medicine*, 8(8), pp.825–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12118247> [Accessed March 2, 2015].
- Bortolato, M. et al., 2010. The Degradation of Serotonin: Role of MAO. , 42(2), pp.157–162. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1569733910700795>.
- Brewer, G.J. et al., 1993. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented neurobasal™, a new serum-free medium combination. *Journal of Neuroscience Research*, 35(5), pp.567–576. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8377226> [Accessed September 11, 2017].
- Brischoux, F. et al., 2002. Time of genesis determines projection and neurokinin-3 expression patterns of diencephalic neurons containing melanin-concentrating hormone. *The European journal of neuroscience*, 16(9), pp.1672–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12431219> [Accessed March 2, 2015].

- Brischoux, F., Fellmann, D. & Risold, P.Y., 2001. Ontogenetic development of the diencephalic MCH neurons: a hypothalamic "MCH area" hypothesis. *The European journal of neuroscience*, 13(9), pp.1733–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11359525> [Accessed March 2, 2015].
- Brownstein, M.J., 1980. Peptidergic pathways in the central nervous system. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 210(1178), pp.79–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6159654> [Accessed September 3, 2017].
- Buma, P., Synaptic and nonsynaptic release of neuromediators in the central nervous system. *Acta morphologica Neerlandica-Scandinavica*, 26(2–3), pp.81–113. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2908165> [Accessed September 4, 2017].
- Celada, P. et al., 2001. Control of dorsal raphe serotonergic neurons by the medial prefrontal cortex: Involvement of serotonin-1A, GABA(A), and glutamate receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(24), pp.9917–29. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11739599> [Accessed September 3, 2017].
- Celada, P. & Artigas, F., 1993. Monoamine oxidase inhibitors increase preferentially extracellular 5-hydroxytryptamine in the midbrain raphe nuclei. A brain microdialysis study in the awake rat. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 347(6), pp.583–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7689703> [Accessed September 1, 2017].
- Chazal, G. & Ralston, H.J., 1987. Serotonin-containing structures in the nucleus raphe dorsalis of the cat: an ultrastructural analysis of dendrites, presynaptic dendrites, and axon terminals. *The Journal of comparative neurology*, 259(3), pp.317–29. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/cne.902590302> [Accessed September 4, 2017].
- Chen, Y. et al., 2002. Targeted disruption of the melanin-concentrating hormone receptor-1 results in hyperphagia and resistance to diet-induced obesity. *Endocrinology*, 143(7), pp.2469–77. Available at: <https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/endo.143.7.8903> [Accessed September 1, 2017].
- Cheng, F.-C. & Kuo, J.-S., 1995. High-performance liquid chromatographic analysis with electrochemical detection of biogenic amines using microbore columns. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 665(1), pp.1–13. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/037843479400504X> [Accessed November 10, 2015].
- Chung, S., Saito, Y. & Civelli, O., 2009. MCH receptors/gene structure-in vivo expression. *Peptides*, 30(11), pp.1985–9. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196978109003088> [Accessed September 1, 2017].
- Croizier, S. et al., 2015. Characterization of a mammalian prosencephalic functional plan. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8(January), pp.1–13. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnana.2014.00161/abstract>.
- Croizier, S. et al., 2011. Development of posterior hypothalamic neurons enlightens a switch in the prosencephalic basic plan. *PloS one*, 6(12), p.e28574. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22194855> [Accessed November 15, 2017].

- Czesak, M. et al., 2007. Characterization of rat rostral raphe primary cultures: Multiplex quantification of serotonergic markers. *Journal of Neuroscience Methods*, 164(1), pp.59–67. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165027007001768> [Accessed September 4, 2017].
- D. BECQUET, M. HERY, A. M. FRANCOIS-BELLAN, FRANCOIS-BELLAN, P. GIRAUD, P. DEPRez, M. FAUDON, M.P.F. and F.H., 1993. GLUTAMATE , GABA , GLYCINE AND TAURINE MODULATE SEROTONIN SYNTHESIS AND RELEASE IN ROSTRAL AND CAUDAL RHOMBENCEPHALIC RAPHE CELLS IN PRIMARY CULTURES. , 23(3).
- D'Souza, U.M. & Craig, I.W., 2010. 2-Genetic Organization of the Serotonergic System., Elsevier B.V. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1569733910701016>.
- DAHLSTROEM, A. & FUXE, K., 1964. EVIDENCE FOR THE EXISTENCE OF MONOAMINE-CONTAINING NEURONS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. I. DEMONSTRATION OF MONOAMINES IN THE CELL BODIES OF BRAIN STEM NEURONS. *Acta physiologica Scandinavica. Supplementum*, p.SUPPL 232:1-55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14229500> [Accessed August 17, 2015].
- Daubert, E. a. & Condron, B.G., 2010. Serotonin: A regulator of neuronal morphology and circuitry. *Trends in Neurosciences*, 33(9), pp.424–434. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2010.05.005>.
- De-Miguel, F.F. & Trueta, C., 2005. Synaptic and extrasynaptic secretion of serotonin. *Cellular and molecular neurobiology*, 25(2), pp.297–312. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16047543> [Accessed September 2, 2017].
- Dey, R.D. & Hoffpauir, J.M., 1986. Ultrastructural colocalization of the bioactive mediators 5-hydroxytryptamine and bombesin in endocrine cells of human fetal airways. *Cell and tissue research*, 246(1), pp.119–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3779794> [Accessed September 4, 2017].
- Djavadian, R.L., 2004. Serotonin and neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of adult mammals. *Acta neurobiologiae experimentalis*, 64(2), pp.189–200. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15366252> [Accessed September 8, 2017].
- Erickson, J.D. et al., 1996. Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(10), pp.5166–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8643547> [Accessed September 1, 2017].
- ERSPAMER, V. & ASERO, B., 1952. Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature*, 169(4306), pp.800–1. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14941051> [Accessed September 2, 2017].
- Ferrer, A. & Artigas, F., 1994. Effects of single and chronic treatment with tranlycypromine on extracellular serotonin in rat brain. *European journal of pharmacology*, 263(3), pp.227–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7531152> [Accessed September 3, 2017].
- Finberg, J.P.M. & Youdim, M.B.H., 1983. Selective mao a and b inhibitors: Their mechanism of action and pharmacology. *Neuropharmacology*, 22(3 PART 2), pp.441–446.

- Fried, G. et al., 1985. Evidence for differential localization of noradrenaline and neuropeptide Y in neuronal storage vesicles isolated from rat vas deferens. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 5(2), pp.450–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3838344> [Accessed September 4, 2017].
- Galter, D. et al., 1999. Regulation of the transmitter phenotype of rostral and caudal groups of cultured serotonergic raphe neurons. *Neuroscience*, 88(2), pp.549–59. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10197774> [Accessed September 25, 2015].
- Ghijsen, W.E.J.M. & Miriam Leenders, A.G., 2005. Differential signaling in presynaptic neurotransmitter release. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(9), pp.937–954. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-004-4525-0> [Accessed September 4, 2017].
- Giffard, R.G. & Ouyang, Y.B., 2010. Cell Culture: Primary Neural Cells. *Encyclopedia of Neuroscience*, pp.633–637.
- Halgren, E. & Varon, S., 1972. Serotonin turnover in cultured raphe nuclei from newborn rat: in vitro development and drug effects. *Brain Research*, 48, pp.438–442. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006899372902077> [Accessed August 14, 2017].
- Hanriot, L. et al., 2007. Characterization of the melanin-concentrating hormone neurons activated during paradoxical sleep hypersomnia in rats. *The Journal of comparative neurology*, 505(2), pp.147–57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17853446> [Accessed March 2, 2015].
- Harandi, M. et al., 1987. ??-Aminobutyric acid and 5-hydroxytryptamine interrelationship in the rat nucleus raphe dorsalis: Combination of radioautographic and immunocytochemical techniques at light and electron microscopy levels. *Neuroscience*, 21(1), pp.237–251.
- Harthoorn, L.F. et al., 2005. Multi-transcriptional profiling of melanin-concentrating hormone and orexin-containing neurons. *Cellular and molecular neurobiology*, 25(8), pp.1209–23. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s10571-005-8184-8> [Accessed November 1, 2017].
- Hawes, B.E. et al., 2000. The Melanin-Concentrating Hormone Receptor Couples to Multiple G Proteins to Activate Diverse Intracellular Signaling Pathways. *Endocrinology*, 141(12), pp.4524–4532. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11108264> [Accessed September 4, 2017].
- Hervás, I. et al., 2001. Desensitization of 5-HT_{1A} Autoreceptors by a Low Chronic Fluoxetine Dose Effect of the Concurrent Administration of WAY-100635. *Neuropsychopharmacology*, 24(1), pp.11–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11106871> [Accessed September 3, 2017].
- Hervieu, G.J. et al., 2000. The distribution of the mRNA and protein products of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor gene, *slc-1*, in the central nervous system of the rat. *The European journal of neuroscience*, 12(4), pp.1194–216. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10762350> [Accessed March 2, 2015].
- Héry, F. et al., 1999. Identification and role of serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors in primary cultures of rat embryonic rostral raphe nucleus neurons. *Journal of neurochemistry*, 72(5), pp.1791–801. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10217255> [Accessed September 4, 2017].

Héry, F. & Ternaux, J.P., 1981. Regulation of release processes in central serotonergic neurons. *Journal de physiologie*.

Héry, M. et al., 2000. The effects of serotonin on glucocorticoid receptor binding in rat raphe nuclei and hippocampal cells in culture. *Journal of neurochemistry*, 74(1), pp.406–413.

Hjorth, S. & Sharp, T., 1991. Effect of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT on the release of 5-HT in dorsal and median raphe-innervated rat brain regions as measured by in vivo microdialysis. *Life sciences*, 48(18), pp.1779–86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1826937> [Accessed September 3, 2017].

Hökfelt, T. et al., 2000. Neuropeptides--an overview. *Neuropharmacology*, 39(8), pp.1337–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10818251> [Accessed September 28, 2017].

Holmes, A. et al., 2003. Neuropeptide systems as novel therapeutic targets for depression and anxiety disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*, 24(11), pp.580–588. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14607081> [Accessed September 28, 2017].

Holtzheimer, P.E. & Nemeroff, C.B., 2006. Advances in the treatment of depression. *NeuroRX*, 3(1), pp.42–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16490412> [Accessed September 4, 2017].

Humpel, C., 2015. Organotypic brain slice cultures: A review. *Neuroscience*, 305, pp.86–98. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452215007162>.

Jacobs, B.L., 2002. Adult brain neurogenesis and depression. *Brain, behavior, and immunity*, 16(5), pp.602–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12401475> [Accessed September 8, 2017].

Jacobs, B.L. & Azmitia, E.C., 1992. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiological reviews*, 72(1), pp.165–229. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1731370> [Accessed September 3, 2017].

Johnson, D.A., Gartside, S.E. & Ingram, C.D., 2002. 5-HT_{1A} receptor-mediated autoinhibition does not function at physiological firing rates: evidence from in vitro electrophysiological studies in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropharmacology*, 43(6), pp.959–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12423665> [Accessed September 17, 2017].

Karhunen, T. et al., 2001. Targeting of peptidergic vesicles in cotransmitting terminals. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(3), p.RC127. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11157098> [Accessed September 4, 2017].

Kawauchi, H. et al., 1983. Characterization of melanin-concentrating hormone in chum salmon pituitaries. *Nature*, 305(5932), pp.321–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6621686> [Accessed March 2, 2015].

Keller, M.B. et al., 1992. Time to recovery, chronicity, and levels of psychopathology in major depression. A 5-year prospective follow-up of 431 subjects. *Archives of general psychiatry*, 49(10), pp.809–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1417434> [Accessed March 2, 2015].

Kits, K.S. et al., 1997. High intracellular calcium levels during and after electrical discharges in molluscan peptidergic

- neurons. *Neuroscience*, 79(1), pp.275–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9244856> [Accessed September 4, 2017].
- de Kock, C.P.J. et al., 2006. NMDA receptors trigger neurosecretion of 5-HT within dorsal raphe nucleus of the rat in the absence of action potential firing. *The Journal of physiology*, 577(Pt 3), pp.891–905. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1113/jphysiol.2006.115311> [Accessed September 2, 2017].
- König, N., Wilkie, M.B. & Lauder, J.M., 1988. Tyrosine hydroxylase and serotonin containing cells in embryonic rat rhombencephalon: a whole-mount immunocytochemical study. *Journal of neuroscience research*, 20, pp.212–223.
- Lagos, P., Urbanavicius, J., et al., 2011. Depressive-like profile induced by MCH microinjections into the dorsal raphe nucleus evaluated in the forced swim test. *Behavioural brain research*, 218(2), pp.259–66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21056060> [Accessed March 2, 2015].
- Lagos, P. et al., 2009. Effects on sleep of melanin-concentrating hormone (MCH) microinjections into the dorsal raphe nucleus. *Brain research*, 1265, pp.103–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19230831> [Accessed March 2, 2015].
- Lagos, P., Torterolo, P., et al., 2011. Immunoneutralization of melanin-concentrating hormone (MCH) in the dorsal raphe nucleus: Effects on sleep and wakefulness. *Brain Research*, 1369(b), pp.112–118. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21078307> [Accessed September 28, 2017].
- Lautenschlager, M. et al., 2000. Serotonin uptake and release mechanisms in developing cultures of rat embryonic raphe neurons: Age- and region-specific differences. *Neuroscience*, 99(3), pp.519–527.
- Lidov, H.G. & Molliver, M.E., 1982. Immunohistochemical study of the development of serotonergic neurons in the rat CNS. *Brain research bulletin*, 9(1–6), pp.559–604. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6756556>.
- Liposits, Z., Göröcs, T. & Trombitás, K., 1985. Ultrastructural analysis of central serotonergic neurons immunolabeled by silver-gold-intensified diaminobenzidine chromogen. Completion of immunocytochemistry with X-ray microanalysis. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 33(6), pp.604–10. Available at: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/33.6.3889144> [Accessed September 4, 2017].
- Liu, J. & Lauder, J.M., 1991. Serotonin and nialamide differentially regulate survival and growth of cultured serotoni and catecholamine neurons. *Developmental Brain Research*, 60, pp.59–67.
- Loizou, L.A., 1972. The postnatal ontogeny of monoamine-containing neurones in the central nervous system of the albino rat. *Brain research*, 40(2), pp.395–418. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4537284> [Accessed September 4, 2017].
- LOVENBERG, W., WEISSBACH, H. & UDENFRIEND, S., 1962. Aromatic L-amino acid decarboxylase. *The Journal of biological chemistry*, 237, pp.89–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14466899> [Accessed September 21, 2017].
- Luján, R., Shigemoto, R. & López-Bendito, G., 2005. Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. *Neuroscience*, 130(3), pp.567–580.

- MacNeil, D.J., 2013. The Role of Melanin-Concentrating Hormone and Its Receptors in Energy Homeostasis. *Frontiers in Endocrinology*, 4, p.49. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23626585> [Accessed September 1, 2017].
- Mefford, I.N., 1981. Application of high performance liquid chromatography with electrochemical detection to neurochemical analysis: measurement of catecholamines, serotonin and metabolites in rat brain. *Journal of Neuroscience Methods*, 3(3), pp.207–224.
- Meister, B., 2007. Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight. *Physiology & behavior*, 92(1–2), pp.263–71. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031938407002065> [Accessed November 1, 2017].
- Melander, T. et al., 1986. Coexistence of galanin-like immunoreactivity with catecholamines, 5-hydroxytryptamine, GABA and neuropeptides in the rat CNS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 6(12), pp.3640–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2432203> [Accessed October 10, 2017].
- Mlinar, B. et al., 2015. Nonexocytotic serotonin release tonically suppresses serotonergic neuron activity. *The Journal of general physiology*, 145(3), pp.225–51. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4338157&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Mosko, S.S., Haubrich, D. & Jacobs, B.L., 1977. Serotonergic afferents to the dorsal raphe nucleus: evidence from HRP and synaptosomal uptake studies. *Brain research*, 119(2), pp.269–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/830388> [Accessed September 4, 2017].
- Moukhles, H. et al., 1997. Quantitative and morphometric data indicate precise cellular interactions between serotonin terminals and postsynaptic targets in rat substantia nigra. *Neuroscience*, 76(4), pp.1159–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9027876> [Accessed September 21, 2017].
- Nagayasu, K. et al., 2013. Chronic effects of antidepressants on serotonin release in rat raphe slice cultures: high potency of milnacipran in the augmentation of serotonin release. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)*, 16(10), pp.2295–306. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23920436> [Accessed November 18, 2015].
- Nagayasu, K. et al., 2010. Utility of organotypic raphe slice cultures to investigate the effects of sustained exposure to selective 5-HT reuptake inhibitors on 5-HT release. *British journal of pharmacology*, 161(7), pp.1527–41. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3010565&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 2, 2015].
- Nahon, J.-L., 2006. The melanocortins and melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behavior and energy homeostasis. *Comptes rendus biologiques*, 329(8), pp.623–38–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16860280> [Accessed March 2, 2015].
- NAHON, J.L. et al., 1989. The Rat Melanin-Concentrating Hormone Messenger Ribonucleic Acid Encodes Multiple Putative Neuropeptides Coexpressed in the Dorsolateral Hypothalamus*. *Endocrinology*, 125(4), pp.2056–2065. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2477226> [Accessed September 3, 2017].

- Naiman, N. et al., 1989. 2-(Alkylamino)tetralin derivatives: interaction with 5-HT_{1A} serotonin binding sites. *Journal of medicinal chemistry*, 32(1), pp.253–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2521252> [Accessed December 15, 2017].
- O’Leary, O.F. et al., 2007. Depletion of serotonin and catecholamines block the acute behavioral response to different classes of antidepressant drugs in the mouse tail suspension test. *Psychopharmacology*, 192(3), pp.357–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17318507> [Accessed November 10, 2015].
- Ögren, S.O. et al., 2008. The role of 5-HT_{1A} receptors in learning and memory. *Behavioural Brain Research*, 195(1), pp.54–77. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432808000971> [Accessed September 26, 2017].
- Olmos, G. et al., 1993. Chronic treatment with the monoamine oxidase inhibitors clorgyline and pargyline down-regulates non-adrenoceptor [³H]-idazoxan binding sites in the rat brain. *British journal of pharmacology*, 108(3), pp.597–603. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8385528> [Accessed December 15, 2017].
- Olson, L. & Seiger, A., 1972. Early prenatal ontogeny of central monoamine neurons in the rat: fluorescence histochemical observations. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte*, 137(3), pp.301–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4674067> [Accessed September 4, 2017].
- Palego, L. et al., 1999. Effects of postmortem delay on serotonin and (+)8-OH-DPAT-mediated inhibition of adenylyl cyclase activity in rat and human brain tissues. *Brain research*, 816(1), pp.165–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9878719> [Accessed September 3, 2017].
- Paolillo, M. et al., 1993. Measurement of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid in cultured rat mesencephalic neurons by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 613(2), pp.231–237. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/037843479380137S> [Accessed October 6, 2017].
- Parkes, D. & Vale, W., 1992. Secretion of melanin-concentrating hormone and neuropeptide-EI from cultured rat hypothalamic cells. *Endocrinology*, 131(4), pp.1826–31. Available at: <https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/endo.131.4.1327720> [Accessed September 3, 2017].
- Parnham, M.J. et al., 1994. *Progress in Drug Research / Fortschritte der Arzneimittelforschung / Progrès des recherches pharmaceutiques*. E. Jucker, ed., Basel: Birkhäuser Basel. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-0348-7153-2> [Accessed December 15, 2017].
- Patel, B.A. et al., 2005. Simple and rapid determination of serotonin and catecholamines in biological tissue using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography B*, 818(2), pp.269–276. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023205000619>.
- Paxinos, G., 1995. *Atlas of the Developing Rat Nervous System*,
- Pissios, P. et al., 2003. Melanin-Concentrating Hormone Receptor 1 Activates Extracellular Signal-Regulated Kinase and Synergizes with G_s-Coupled Pathways. *Endocrinology*, 144(8), pp.3514–3523. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12865333> [Accessed September 4, 2017].

- Plenevaux, A. et al., 2002. Tissue Distribution, Autoradiography, and Metabolism of 4-(2'-Methoxyphenyl)-1-[2' -[N-2''-Pyridinyl)-p-[18F]Fluorobenzamido]ethyl]piperazine (p-[18F]MPPF), a New Serotonin 5-HT1A Antagonist for Positron Emission Tomography. *Journal of Neurochemistry*, 75(2), pp.803–811. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1471-4159.2000.0750803.x> [Accessed December 15, 2017].
- Pompeiano, M., Palacios, J.M. & Mengod, G., 1992. Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT1A receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 12(2), pp.440–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1531498> [Accessed September 2, 2017].
- Porsolt, R.D. et al., 1978. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *European journal of pharmacology*, 47(4), pp.379–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/204499> [Accessed March 2, 2015].
- Praag, H.M., 1977. The Harold E. Himwich Memorial Lecture. Significance of biochemical parameters in the diagnosis, treatment, and prevention of depressive disorders. *Biological psychiatry*, 12(1), pp.101–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/300032> [Accessed September 4, 2017].
- Qu, D. et al., 1996. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature*, 380(6571), pp.243–247. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8637571> [Accessed September 7, 2017].
- RAPPORT, M.M., GREEN, A.A. & PAGE, I.H., 1948. Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *The Journal of biological chemistry*, 176(3), pp.1243–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18100415> [Accessed September 2, 2017].
- Risold, P.Y. et al., 2009. The development of the MCH system. *Peptides*, 30(11), pp.1969–1972.
- Robert, P.H. & Benoit, M., 2008. Chapter 2 Neurochemistry of cognition: serotonergic and adrenergic mechanisms. *Handbook of Clinical Neurology*, 88(2), pp.31–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18654635> [Accessed September 1, 2017].
- Romero, L., Hervás, I. & Artigas, F., 1996. The 5-HT1A antagonist WAY-100635 selectively potentiates the presynaptic effects of serotonergic antidepressants in rat brain. *Neuroscience letters*, 219(2), pp.123–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8971795> [Accessed September 3, 2017].
- Rotzinger, S., Lovejoy, D.A. & Tan, L.A., 2010. Behavioral effects of neuropeptides in rodent models of depression and anxiety. *Peptides*, 31(4), pp.736–756. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20026211> [Accessed September 28, 2017].
- Saito, Y. et al., 2004. Properties of rat melanin-concentrating hormone receptor 1 internalization. *Peptides*, 25(10 SPEC. ISS.), pp.1597–1604.
- Saito, Y. & Nagasaki, H., 2008. The melanin-concentrating hormone system and its physiological functions. Results and problems in cell differentiation, 46, pp.159–79. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18227983>

[Accessed March 2, 2015].

- Sakurai, A. & Katz, P.S., 2003. Spike timing-dependent serotonergic neuromodulation of synaptic strength intrinsic to a central pattern generator circuit. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(34), pp.10745–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14645466> [Accessed September 4, 2017].
- Sanabria-Bohórquez, S.M. et al., 2002. Quantification of 5-HT(1A) receptors in human brain using p-MPPF kinetic modelling and PET. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 29(1), pp.76–81. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00259-001-0684-2> [Accessed September 2, 2017].
- Santana, N. et al., 2004. Expression of Serotonin1A and Serotonin2A Receptors in Pyramidal and GABAergic Neurons of the Rat Prefrontal Cortex. *Cerebral Cortex*, 14(10), pp.1100–1109. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15115744> [Accessed September 2, 2017].
- SARI, Y., 2004. Serotonin receptors: from protein to physiological function and behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 28(6), pp.565–582. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15527863> [Accessed September 3, 2017].
- Sharp, T., Gartside, S.E. & Umbers, V., 1997. Effects of co-administration of a monoamine oxidase inhibitor and a 5-HT1A receptor antagonist on 5-hydroxytryptamine cell firing and release. *European Journal of Pharmacology*, 320(1), pp.15–19. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299996009685> [Accessed September 14, 2017].
- Shikanai, H. et al., 2012. Distinct neurochemical and functional properties of GAD67-containing 5-HT neurons in the rat dorsal raphe nucleus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(41), pp.14415–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23055511>.
- Sprouse, J.S. & Aghajanian, G.K., 1986. (-)-Propranolol blocks the inhibition of serotonergic dorsal raphe cell firing by 5-HT1A selective agonists. *European journal of pharmacology*, 128(3), pp.295–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2878817> [Accessed September 3, 2017].
- Sprouse, J.S. & Aghajanian, G.K., 1987. Electrophysiological responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT1A and 5-HT1B agonists. *Synapse (New York, N.Y.)*, 1(1), pp.3–9. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/syn.890010103> [Accessed September 3, 2017].
- Tortorolo, P. et al., 2006. MCH-containing neurons in the hypothalamus of the cat: searching for a role in the control of sleep and wakefulness. *Brain research*, 1119(1), pp.101–14. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1802635&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 2, 2015].
- Tortorolo, P., Lagos, P. & Monti, J.M., 2011. Melanin-concentrating hormone one: A new sleep factor? *Frontiers in Neurology*, MAR(March), pp.1–12.
- Trivedi, M.H., 2006. Major depressive disorder: remission of associated symptoms. *The Journal of clinical psychiatry*, 67 Suppl 6(Mdd), pp.27–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16848674> [Accessed September 3,

2017].

- UDENFRIEND, S. et al., 1956. Biogenesis and metabolism of 5-hydroxyindole compounds. *The Journal of biological chemistry*, 219(1), pp.335–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13295286> [Accessed September 2, 2017].
- Underwood, M.D. et al., 1999. Morphometry of the dorsal raphe nucleus serotonergic neurons in suicide victims. *Biological psychiatry*, 46(4), pp.473–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10459396> [Accessed September 4, 2017].
- Urbanavicius, J. et al., 2014. Prodepressive effect induced by microinjections of MCH into the dorsal raphe. *Behavioural Pharmacology*, 25(4), pp.316–324. Available at: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00008877-201408000-00007>.
- Valdizán, E.M., Castro, E. & Pazos, A., 2010. Agonist-dependent modulation of G-protein coupling and transduction of 5-HT_{1A} receptors in rat dorsal raphe nucleus. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 13(7), pp.835–843. Available at: <https://academic.oup.com/ijnp/article-lookup/doi/10.1017/S1461145709990940> [Accessed September 3, 2017].
- Verhage, M. et al., 1991. Differential release of amino acids, neuropeptides, and catecholamines from isolated nerve terminals. *Neuron*, 6(4), pp.517–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2015091> [Accessed November 1, 2017].
- Verret, L. et al., 2003. A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. *BMC neuroscience*, 4, p.19. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=201018&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 2, 2015].
- Viale, A. et al., 1999. Cellular localization and role of prohormone convertases in the processing of pro-melanin concentrating hormone in mammals. *The Journal of biological chemistry*, 274(10), pp.6536–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10037747> [Accessed September 3, 2017].
- Wallace, J.A. & Lauder, J.M., 1983. Development of the serotonergic system in the rat embryo: an immunocytochemical study. *Brain research bulletin*, 10(4), pp.459–79. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6344960> [Accessed September 2, 2017].
- Wallace, J. a & Lauder, J.M., 1983. Development of the serotonergic system in the rat embryo: an immunocytochemical study. *Brain research bulletin*, 10(505), pp.459–479.
- Walther, D.J. & Bader, M., 2003. A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochemical pharmacology*, 66(9), pp.1673–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14563478> [Accessed September 2, 2017].
- Whitaker-Azmitia, P., 1999. The Discovery of Serotonin and its Role in Neuroscience. *Neuropsychopharmacology*, 21(2), p.2S–8S. Available at: [http://www.nature.com/doi/10.1016/S0893-133X\(99\)00031-7](http://www.nature.com/doi/10.1016/S0893-133X(99)00031-7) [Accessed November 1, 2017].

- de Wit, J. et al., 2009. LRRTM2 Interacts with Neurexin1 and Regulates Excitatory Synapse Formation. *Neuron*, 64(6), pp.799–806. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627309010095> [Accessed September 4, 2017].
- Yamamoto, M., Steinbusch, H.W.M. & Jessell, T.M., 1981. Differentiated properties of identified serotonin neurons in dissociated cultures of embryonic rat brain stem. *Journal of Cell Biology*, 91(1), pp.142–152.
- Young, S.N., 1993. The use of diet and dietary components in the study of factors controlling affect in humans: a review. *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN*, 18(5), pp.235–44. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1188544&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 2, 2015].
- Zahniser, N.R. & Doolen, S., 2001. Chronic and acute regulation of Na⁺/Cl⁻ -dependent neurotransmitter transporters: drugs, substrates, presynaptic receptors, and signaling systems. *Pharmacology & therapeutics*, 92(1), pp.21–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11750035> [Accessed September 2, 2017].
- Zhou, F.C., Sari, Y. & Zhang, J.K., 2000. Expression of serotonin transporter protein in developing rat brain. *Brain Res Dev Brain Res*, 119(1), pp.33–45. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10648870.
- Zhou, J., 2004. Norepinephrine transporter inhibitors and their therapeutic potential. *Drugs of the Future*, 29(12), pp.1235–1244. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16871320> [Accessed November 1, 2017].
- Zhu, P.C., Thureson-Klein, A. & Klein, R.L., 1986. Exocytosis from large dense cored vesicles outside the active synaptic zones of terminals within the trigeminal subnucleus caudalis: a possible mechanism for neuropeptide release. *Neuroscience*, 19(1), pp.43–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2431353> [Accessed September 4, 2017].
- Zobel, A.W. et al., 2000. Effects of the high-affinity corticotropin-releasing hormone receptor 1 antagonist R121919 in major depression: the first 20 patients treated. *Journal of Psychiatric Research*, 34(3), pp.171–181. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10867111> [Accessed September 28, 2017].