



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA DE PUEBLA**



**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA  
LABORATORIO DE NEUROMODULACIÓN**

**“MODULACIÓN SEROTONINÉRGICA DE LAS CORRIENTES ACTIVADAS POR  
GLUTAMATO EN NEURONAS PIRAMIDALES DE LAS CAPAS V – VI DE CORTEZA  
PREFRONTAL DE RATAS EXPUESTAS A UNA HIPERSEROTONINEMIA MATERNA  
DURANTE LA GESTACIÓN”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS**

**PRESENTA**

M. EN C. LUIS GUSTAVO HERNÁNDEZ CARBALLO

**DIRECTOR DE TESIS**

DR. JORGE LUIS VALENTE FLORES HERNÁNDEZ

**COMITÉ TOTORAL**

DR. FABIÁN GALINDO RAMÍREZ

DR. ELIAS MANJARREZ LÓPEZ

DRA. PATRICIA CAMPOS BEDOLLA

DR. FATUEL TECUAPETLA

**OCTUBRE 2020**

## AGRADECIMIENTOS

---

Las palabras tal vez no sean suficientes, tanto es lo que se tiene que decir, que elegir solo un puñado de ellas es casi imposible. Y es que no creo que existan las palabras que describan en su plenitud el agradecimiento que tengo a todos aquellos que conforman mi presente y mi pasado. Sin embargo, las palabras ya antes se han dicho y los nombres ya han sido tantas veces mencionados, a pesar de nada haberse vociferado. Por tanto, resumiré mi agradecimiento en solo un “gracias” y perpetuare en letras solo el nombre de los que de algún modo han escrito ésta tesis, no porque sean los únicos, sino porque son los que dejaron en ella su marca tangible.

Gracias a el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) pues sin la beca que me otorgaron éste trabajo nunca hubiera siquiera comenzado.

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP) ya que nada hubiera podido ser realizado sin los recursos que provee.

A el personal del Bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) y en especial a el Dr. Francisco, pues son ellos quienes cuidan a ese pilar de la ciencia que son los animales de laboratorio.

A todos y a cada uno de los doctores del Instituto de Fisiología de la BUAP, por todo lo que me han enseñado.

De manera especial, a el Dr. Jorge L. V. Flores-Hernández, por sus consejos, su apoyo, su instrucción y su guía, pero, sobre todo, por su amistad. Le debo mucho Dr. Jorge, entre ello, el amor y respeto que hoy siento por ésta hermosa ciencia que usted me enseñó, por lo cual le estoy profundamente agradecido.

A la M. en C. Evelyn A. Ruiz Luna, por siempre haber estado para apoyarme en buenas y malas, por ser mi amiga y compañera, por las largas platicas, por lo que me enseñaste, por ser tú. ¡Gracias por ser!

A Carolina Galicia y Luis Haro, por su amistad, su paciencia y por dejarme compartirles un poco de lo que he aprendido.

A mis amigos Paco, Norma, Doglas, Ángel y Jimmy, pues ya son tantos los años que llevan apoyándome y animándome a seguir. ¡Gracias Carnales!

A mi familia, por su apoyo incondicional en todos los aspectos de mi vida, por animarme y por nunca dejarme caer.

A mis padres Martha Alicia Carballo Jiménez e Higinio Hernández Quezada, al igual que a mi tío Ángel Alfonso Carballo Jiménez, por su apoyo, su amor, su confianza, por todo. Simplemente nada sería realidad sin ustedes.

A Amalia Martínez Alcantar, por ser mi compañera, por aguantarme, por apoyarme, por ser mi pilar y mi fuerza, por estar conmigo, por todo, por mi presente y por nuestro futuro. ¡Porque nadie puede ser más que tú!

A todos ustedes y ya que ninguna palabra es realmente suficiente, simplemente:

**¡Gracias!**

## ÍNDICE

---

Agradecimientos .....	I
Índice.....	III
Índice de Tablas .....	V
Índice de Figuras .....	VI
Lista de Abreviaturas .....	VII
Resumen .....	1
1 Introducción.....	2
1.1 Corteza Prefrontal.....	2
1.1.1 Definición y Generalidades .....	2
1.1.2 Función.....	4
1.1.3 Arquitectura y Composición celular.....	5
1.2 Transmisión Glutamatérgica .....	14
1.2.1 Glutamato .....	14
1.2.2 Receptores Ionotrópicos de Glutamato.....	16
1.3 Neuromodulación de la Corteza Prefrontal.....	19
1.3.1 Serotonina.....	20
1.3.1.1 Generalidades .....	20
1.3.1.2 Receptores Serotoninérgicos .....	21
1.4 Modulación Serotoninérgica de la Corteza Prefrontal .....	22
1.5 Serotonina Durante el Neurodesarrollo .....	26
1.6 Modelo de hiperserotoninemia durante el desarrollo (DHS) .....	27
2 Planteamiento del problema .....	30
3 Hipótesis.....	33
4 Objetivos .....	34
4.1 General.....	34
4.2 Particulares .....	34
5 Metodología.....	35
5.1 Tratamiento Farmacológico.....	35
5.1.1 Elección de la droga .....	35
5.1.2 Dosis.....	35

5.1.3	Inyección .....	36
5.2	Registro Electrofisiológico.....	36
5.2.1	Disociación Aguda .....	36
5.2.2	Técnica de célula completa en protocolos de fijación de voltaje (Whole-cell).....	38
5.2.3	Aplicación de fármacos .....	39
5.2.4	Protocolos electrofisiológicos. ....	39
	Rampa .....	39
	Aplicación de Glutamato o NMDA.....	40
	Glutamato (100 $\mu$ M) + $Mg^{++}$ :.....	41
	Glutamato (100 $\mu$ M) + $Mg^{++}$ + 5-HT:.....	41
	NMDA (100 $\mu$ M) + 5-HT: .....	42
	NMDA (100 $\mu$ M) + Agonista HTR1A (8-OH-DPAT): .....	42
	NMDA (100 $\mu$ M) + Agonista HTR2A (DOI):.....	42
	NMDA (100 $\mu$ M) + 8-OH-DPAT + DOI:.....	42
5.3	Análisis estadístico.....	43
6	Resultados.....	45
6.1	Reducción del componente activado por NMDA de la $I_{Glut}$ producido por la co-aplicación de 5-HT	47
6.2	Cambios en la Modulación Serotoninérgica de la $I_{NMDA}$ .....	51
6.2.1	Cambios en la Modulación de la $I_{NMDA}$ Mediada por el Receptor 5-HT <sub>1A</sub> .....	53
6.2.2	Modulación de la $I_{NMDA}$ Mediada por el Receptor 5-HT <sub>2A</sub> .....	55
7	Discusión .....	60
8	Conclusiones .....	65
9	Bibliografía .....	66
	Anexo 1: Constante de Desensibilización y Relación EE/P .....	109
	Anexo 2: Artículo publicado como primer autor .....	113
	Anexo 3: Artículos publicados como colaborador .....	131

## ÍNDICE DE TABLAS

---

<b>TABLA 1:</b> LIGANDOS Y NEUROMODULADORES UTILIZADOS DURANTE EL REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO DE CÉLULA ÚNICA PARA ANALIZAR LOS CAMBIOS EN LA RESPUESTA MODULADORA DE LA SEROTONINA SOBRE LAS CORRIENTES ACTIVADAS POR GLUTAMATO.....	39
<b>TABLA 2:</b> AMPLITUD DEL PICO Y ESTADO ESTACIONARIO DE LA CORRIENTES PARA CADA CONCENTRACIÓN DE NMDA.....	51
<b>TABLA 3:</b> COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA AMPLITUD DEL PICO Y EL ESTADO ESTACIONARIO DE LA $I_{NMDA}$ PARA CADA CONCENTRACIÓN DE 5-HT. ....	53
<b>TABLA 4:</b> COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA AMPLITUD DEL PICO Y EL ESTADO ESTACIONARIO DE LA $I_{NMDA}$ PARA CADA CONCENTRACIÓN DE 8-OH-DPAT.....	55
<b>TABLA 5:</b> PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA AMPLITUD DEL PICO Y EL ESTADO ESTACIONARIO DE LA $I_{NMDA}$ EN PRESENCIA DE 8-OH-DPAT (30 $\mu$ M), DOI (10 $\mu$ M) Y SU CO-APLICACIÓN. SE PRESENTA TAMBIÉN EL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE DOI TOMANDO COMO LÍNEA BASE EL EFECTO DE 8-OH-DPAT AL SER COAPLICADOS.....	57
<b>TABLA 6:</b> RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LAS POST-PRUEBAS DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE TUKEY UTILIZADAS PARA COMPARAR LA INHIBICIÓN DE LA $I_{NMDA}$ TANTO A NIVEL DE LA AMPLITUD DEL PICO COMO DEL ESTADO ESTACIONARIO CAUSADA POR 8-OH-DPAT (30 $\mu$ M), DOI (10 $\mu$ M) Y SU CO-APLICACIÓN.....	57
<b>TABLA 7:</b> COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA AMPLITUD DEL PICO Y EL ESTADO ESTACIONARIO DE LA $I_{NMDA}$ PARA CADA CONCENTRACIÓN DE DOI.....	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> DIVISIÓN ANATÓMICA DE LA CPF..	2
<b>FIGURA 2:</b> CPF EN RATA.	3
<b>FIGURA 3:</b> REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LAS CAPAS DE LA CPF.	7
<b>FIGURA 4:</b> VARIACIÓN SISTEMÁTICA EN LAS ESTRUCTURAS CORTICALES.	8
<b>FIGURA 5:</b> ILUSTRACIÓN REPRESENTATIVA DE LA ORGANIZACIÓN DE UNA COLUMNA DE LA CPF Y LOS TIPOS CELULARES MÁS REPRESENTATIVOS QUE LA CONFORMAN.	9
<b>FIGURA 6:</b> DIAGRAMA ESQUEMÁTICO QUE MUESTRA UNA NEURONA PIRAMIDAL TÍPICA Y SUS PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS.	12
<b>FIGURA 7:</b> ILUSTRACIÓN DE LAS DISTINTAS NEURONAS PIRAMIDALES ATÍPICAS.	14
<b>FIGURA 8:</b> SÍNTESIS Y RECICLADO DEL GLUTAMATO ENTRE NEURONAS Y CÉLULAS GLIALES.	15
<b>FIGURA 9:</b> RECEPTORES IONOTRÓPICOS Y METABOTRÓPICOS ACTIVADOS POR GLUTAMATO.	19
<b>FIGURA 10:</b> SISTEMA SEROTONINÉRGICO.	21
<b>FIGURA 11:</b> REGULACIÓN SEROTONINÉRGICA DE LA CPF.	25
<b>FIGURA 12:</b> MODELO DEL INTERCAMBIO PROGRESIVO DE LA FUENTE DE 5-HT EN EL CEREBRO FETAL ..	27
<b>FIGURA 13:</b> BASE TEÓRICA DEL MODELO DHS.	28
<b>FIGURA 14:</b> CORTE CORONAL DE CEREBRO DE RATA.	37
<b>FIGURA 15:</b> GRAFICO REPRESENTATIVO DE UNA CORRIENTE ACTIVADA POR GLUTAMATO EN LA CUAL SE SEÑALAN LAS CARACTERÍSTICAS QUE SE ANALIZARON EN CADA UNA DE LAS FASES EXPERIMENTALES EXPUESTAS.	41
<b>FIGURA 16:</b> GRAFICAS DEL SEGUIMIENTO DEL PESO DE LAS MADRES DURANTE EL TRATAMIENTO Y EL PESO PROMEDIO DE LAS CRÍAS DESDE EL PND2 HASTA EL PND21	45
<b>FIGURA 17:</b> HISTOGRAMA DE FRECUENCIA DE LA CAPACITANCIA DE LAS NEURONAS DEL GRUPO CONTROL Y AQUELLAS TRATADAS CON 5-MT.	46
<b>FIGURA 18:</b> EFECTO DE LA 5-HT (30 $\mu$ M) TANTO EN LA AMPLITUD DEL PICO COMO EN EL EE DE LA $I_{GLUT}$ (100 $\mu$ M) EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE $Mg^{++}$ (1 MM).	48
<b>FIGURA 19:</b> EFECTO DE LA 5-HT (30 $\mu$ M) EN LA $I_{GLUT}$ Y $I_{NMDA}$	49
<b>FIGURA 20:</b> CURVAS DOSIS-RESPUESTA DE NMDA DESDE 0.3 $\mu$ M HASTA 300 $\mu$ M PARA AMBOS GRUPOS	50
<b>FIGURA 21:</b> CURVA DOSIS-RESPUESTA DEL EFECTO DE 5-HT DESDE 1 $\mu$ M A 100 $\mu$ M SOBRE LA $I_{NMDA}$ (100 $\mu$ M).	52
<b>FIGURA 22:</b> CURVA DOSIS-RESPUESTA DEL EFECTO EN LA $I_{NMDA}$ (100 $\mu$ M) DE LA APLICACIÓN DESDE 0.1 $\mu$ M HASTA 100 $\mu$ M DE 8-OH-DPAT.	54
<b>FIGURA 23:</b> EFECTO DE DPAT (30 $\mu$ M), DOI (10 $\mu$ M) Y SU CO-APLICACIÓN (DPAT 30 $\mu$ M + DOI 10 $\mu$ M) EN LA $I_{NMDA}$ (100 $\mu$ M).	56
<b>FIGURA 24:</b> CURVA DOSIS-RESPUESTA DEL EFECTO EN LA $I_{NMDA}$ (100 $\mu$ M) DE LA APLICACIÓN DE DOI DESDE 0.1 $\mu$ M HASTA 30 $\mu$ M.	58

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>5-HT</b>	5-Hidroxitriptamina
<b>5-HT3AR</b>	Receptor 5-HT3A
<b>5-HTP</b>	5-Hidroxitriptofano
<b>5-MT</b>	5-Metoxitriptamina
<b>8-OH-DPAT</b>	8-hidroxi 2(di-n-propilamino)tetralina
<b>AAD</b>	Aminoácido aromático descarboxilasa
<b>Ach</b>	Acetilcolina
<b>AID</b>	Agranular dorsal
<b>AIV</b>	Agranular ventral
<b>AMPA</b>	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
<b>AMPc</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>BF</b>	Prosencéfalo basal
<b>CaMKII</b>	Calcio calmodulina cinasa II
<b>Cg1</b>	Cingulada anterior
<b>CGRP</b>	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
<b>CLi</b>	Núcleo caudal lineal
<b>COF</b>	Corteza prefrontal orbitofrontal
<b>CPF</b>	Corteza prefrontal
<b>CPFDL</b>	Corteza prefrontal dorsolateral
<b>CPFDM</b>	Corteza prefrontal dorsomedial
<b>CPFVL</b>	Corteza prefrontal ventrolateral
<b>CPFVM</b>	Corteza prefrontal ventromedial
<b>DA</b>	Dopamina
<b>DHS</b>	Hiperserotoninemia durante el desarrollo
<b>DMSO</b>	Di-metil sulfóxido
<b>DOB</b>	1-2,5-dimethoxy-4-bromophenol-2-aminopropane
<b>DOI</b>	2, 5-dimetoxi-4-yodo-anfetamina
<b>DR</b>	Rafé dorsal
<b>EC50</b>	Concentración efectiva 50
<b>EE</b>	Estado Estacionario
<b>GD</b>	Día gestacional
<b>IAHP</b>	Corriente post hiperpolarizante
<b>I<sub>Glut</sub></b>	Corriente de glutamato
<b>IL</b>	Infralímbica
<b>I<sub>NMDA</sub></b>	Corriente de glutamato activada por NMDA
<b>IPSC</b>	Corrientes postsinápticas excitatorias
<b>KA</b>	Kainato
<b>LC</b>	Locus coeruleus o caeruleus
<b>LCPF</b>	Corteza prefrontal lateral
<b>LO</b>	Lateral orbital

<b>mCPF</b>	Corteza media prefrontal
<b>mGluR</b>	Receptor metabotrópico de glutamato
<b>MnR</b>	Núcleo del rafé medial
<b>MO</b>	Corteza prefrontal medial orbital
<b>NA</b>	Noradrenalina
<b>NMDA</b>	N-metil D-aspartato
<b>NR</b>	Núcleos del Rafé
<b>OT</b>	Oxitocina
<b>PKA</b>	Proteína cinasa A
<b>PKC</b>	Proteína cinasa C
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>PND</b>	Día postnatal
<b>PrL</b>	Prelímbica
<b>PV</b>	Parvalbúmina
<b>RMg</b>	Rafé <i>magnus</i>
<b>ROb</b>	Rafé <i>obscurus</i>
<b>Rpa</b>	Rafé <i>pallidus</i>
<b>Sst</b>	Somatostatina
<b>ToM</b>	Teoría de la Mente
<b>TPH</b>	Triptófano hidroxilasa
<b>vCPF</b>	Corteza prefrontal ventral
<b>Vip</b>	Péptido vasoactivo intestinal
<b>VO</b>	Ventral orbital
<b>VTA</b>	Área tegmental ventral
<b><math>\alpha</math>-Me-5-HT</b>	$\alpha$ -metil-serotonina

## RESUMEN

---

Entre los neuromoduladores, la 5-HT ha sido objeto de interés para múltiples investigaciones debido a su amplia distribución en el cerebro, y su papel en conductas las cuales abarcan desde el aprendizaje y memoria hasta la conducta social. Además, debido a su desarrollo temprano, todo un grupo de investigaciones se han realizado para analizar su participación en el neurodesarrollo, proponiendo estos que la alteración de la homeostasis serotoninérgica durante el desarrollo prenatal de las crías resulta en una predisposición a trastornos psiquiátricos. Por otra parte, la CPF se encuentra densamente innervada por axones de los núcleos serotoninérgicos los cuales a su vez reciben proyecciones de las capas profundas de la CPF al igual que múltiples regiones corticales. Por ésta razón, se ha postulado que la alteración o falla de los procesos que regulan el desarrollo del sistema serotoninérgico son capaces de alterar el correcto funcionamiento de la CPF y su intercomunicación con distintas áreas del cerebro.

Con base en lo anterior, en éste trabajo, exploramos, a nivel electrofisiológico, el efecto en crías de ratas Sprague-Dawley de la administración del agonista serotoninérgico no selectivo 5-Metoxitriptamina durante la gestación a través de un análisis de la manera en que la serotonina afecta las corrientes activadas por glutamato, con principal enfoque en las corrientes mediadas por los receptores a glutamato de tipo NMDA y su modulación.

Con este objetivo, se realizó el registro de las corrientes activadas por glutamato bajo la técnica de fijación de fijación en modalidad de célula completa en neuronas piramidales agudamente disociadas de la capa V-VI de la corteza prefrontal de ratas bajo el modelo de hiperserotoninemia durante el desarrollo. De éste modo, encontramos que las crías de ratas tratadas con 5-MT (sc. 1mg/kg/day) desde el GD11 hasta el GD21, presentan diferencias significativas con respecto a los controles en la amplitud del pico y el estado estacionario tanto de las corrientes activadas por glutamato como de las activadas por NMDA en presencia de 5-HT. De manera particular, al analizar por separado la modulación serotoninérgica mediada por los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A</sub>, se encontró que la modulación ejercida por el receptor 5-HT<sub>1A</sub> se encuentra aumentada, a diferencia de la modulación mediada por el receptor 5-HT<sub>2A</sub> la cual permaneció sin cambios significativos.

Nuestros resultados sugieren que el incremento de la concentración un neuromodulador durante la gestación es capaz de inducir cambios en la acción moduladora de las corrientes iónicas durante de los individuos adultos, lo cual puede estar contribuyendo al desarrollo de trastornos psiquiátricos.

# 1 INTRODUCCIÓN

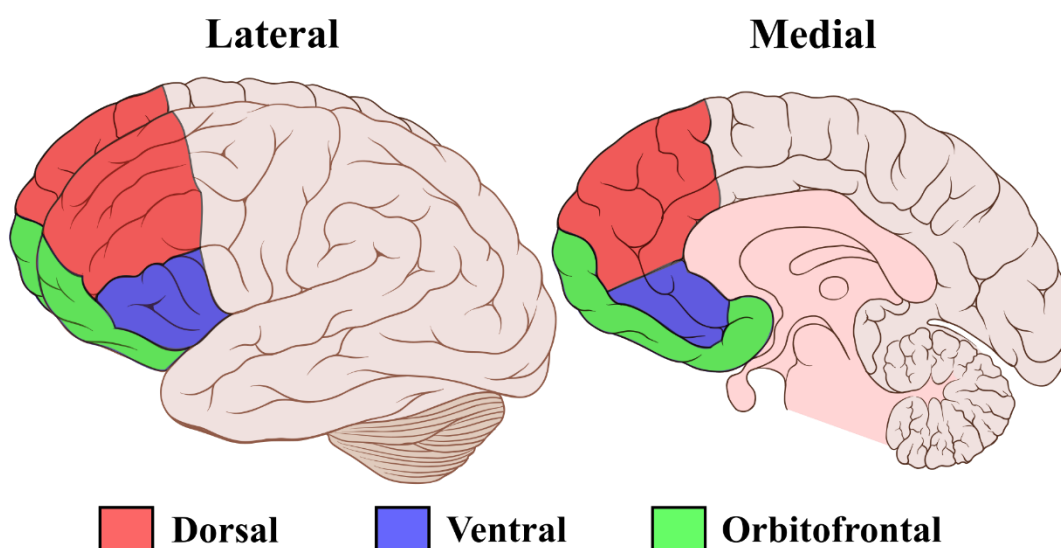
---

## 1.1 Corteza Prefrontal

### 1.1.1 Definición y Generalidades

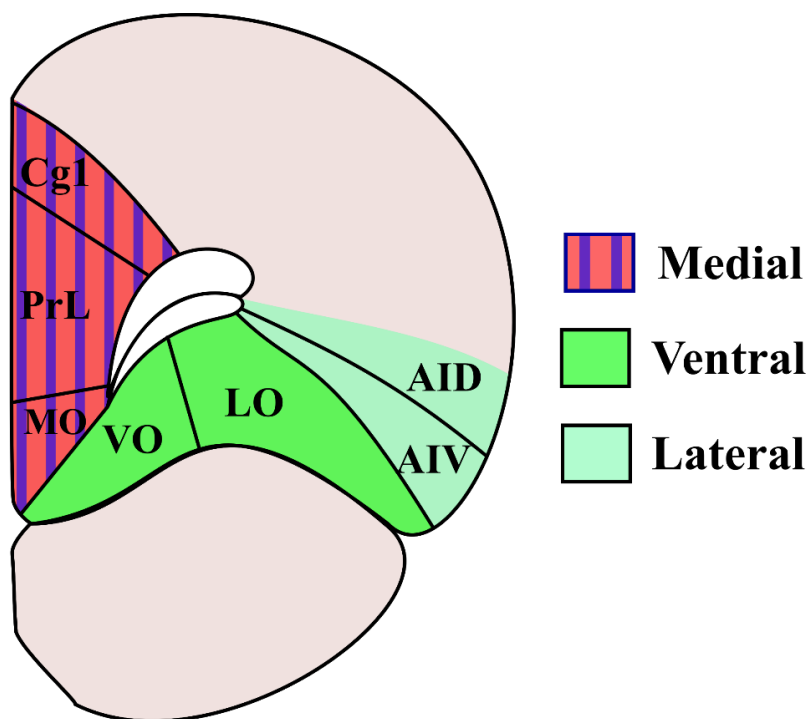
Se denomina Corteza Prefrontal (CPF) a la colección de áreas corticales interconectadas en el polo anterior del cerebro de los mamíferos (Fuster, 2015; Miller, 1999), la cual desde los trabajos de Rose y Woolsey (1948) ha sido caracterizada con base en su fuerte conexión recíproca con el núcleo dorsomedial del tálamo (Dalley *et al.*, 2004; Uylings *et al.*, 2003; Uylings & van Eden, 1991).

Además de su conexión con el núcleo dorsal del tálamo, la CPF envía y recibe proyecciones de prácticamente todos los sistemas corticales sensoriales y motores, así como muchas estructuras subcorticales (Fuster, 2015; Kolb, 1991; Miller & Wallis, 2013). Con respecto a dichas conexiones, así como su citoarquitectura, la CPF de los primates, tanto humanos como no humanos, ha sido dividida de manera general en tres grandes regiones: dorsal, ventral y orbital (Fuster, 2015; Miller & Wallis, 2013), las cuales, a su vez pueden subdividirse de acuerdo a su localización en: dorsolateral (CPF<sub>DL</sub>), ventrolateral (CPF<sub>VL</sub>), dorsomedial (CPF<sub>DM</sub>), ventromedial (CPF<sub>VM</sub>) y orbitofrontal (COF).



**Figura 1:** División anatómica de la CPF. De manera general, la CPF puede dividirse en tres grandes regiones: dorsal, ventral y orbital. Estas regiones son subdivididas y nombradas de acuerdo al plano anatómico en el que pueden observarse, nombrándose como CPF<sub>DL</sub> y CPF<sub>VL</sub>, las subdivisiones encontradas en el plano anatómico lateral, mientras que las encontradas en el plano medial son nombradas como CPF<sub>DM</sub> y CPF<sub>VM</sub>. De acuerdo a ésta misma nomenclatura, la región orbital es llamada COF al ser encontrada en el plano frontal (Fuster, 2015; Miller & Wallis, 2013).

Por otra parte, la existencia de una CPF en la rata se ha puesto en duda en múltiples ocasiones (Carlén, 2017; Uylings *et al.*, 2003), no obstante, principalmente a través de trazado retrógrado (Kolb, 1991; Leonard, 1969, 2016) se han podido identificar tres regiones principales con homología a las áreas de la CPF en primate, las cuales fueron identificadas inicialmente por Christiana M. Leonard (1969). La primera región, denominada CPF media (mCPF), se compone por la corteza cingulada anterior (Cg1); y el componente ventral que incluye las cortezas prelímbica (PrL), infralímbica (IL) y medial orbital (MO). De manera similar, la región denominada CPF ventral (vCPF) incluye la corteza ventral orbital (VO) y lateral orbital (LO). Por último, la llamada CPF lateral (LCPF), se encuentra conformada por las cortezas insular agranular dorsal y ventral (AID y AIV respectivamente). De estas regiones, la mCPF se considera homóloga de las regiones dorsales (CPF DL y CPF DM) y ventrales (CPF DV y CPF VM), mientras que la vCPF se considera homóloga a la COF del primate. Por otro lado, la LPFC no tiene una homología directa con una región de la CPF en el primate, sin embargo, se le atribuyen participación en la memoria de trabajo, la discriminación de estímulos olfativos y gustativos, así como participación en algunas las funciones relativas a la COF (Dalley *et al.*, 2004; Kesner, 2000; Kolb, 1984, 1991)



**Figura 2:** CPF en rata. De manera similar a como se realiza con el cerebro de los primates, las regiones correspondientes a la CPF en la rata se han dividido en tres áreas: medial, ventral y lateral. El área medial se compone de las regiones Cg1, PrL y MO, las cuales en conjunto se han homologado a las regiones ventrales y mediales del cerebro humano. Por su parte el área ventral se compone de las regiones VO y LO, consideradas homologas de la COF. Finalmente, las regiones AID y AIV componen el área lateral de la CPF de la rata, la cual participa en funciones relativas a la COF, sin embargo, no se considera con homología a ésta. (Dalley *et al.*, 2002; Kesner, 2000; Kolb, 1984, 1991)

### 1.1.2 Función

De manera general, no es posible atribuir una función fisiológica específica a ninguna de las regiones de la CPF, ya que en mayor o menor medida todas las áreas se encuentran involucradas en la realización de cada función (Fuster, 2002). No obstante, cada subdivisión tiene patrones de conexión parcialmente únicos, lo cual sugiere la existencia de algunas diferencias funcionales (Miller & Wallis, 2013). Por ejemplo, a grandes rasgos, podemos hablar de que todas las regiones se encuentran involucradas en uno u otro aspecto de la atención, sin embargo, en mayor medida la CPFDM y parte de la CPFVM controlan el impulso y la motivación, mientras que las regiones laterales se encargan principalmente de la memoria de trabajo, y la región COF del control de la inhibición de los impulsos (Fuster, 2002). Con lo anterior en cuenta tiene cabida el mencionar que la CPF es fuertemente asociada con conductas complejas tales como la conducta social, la regulación de las emociones, y las funciones ejecutivas (atención, memoria de trabajo, toma de decisiones y control de impulsos, entre otras), además de participar en los procesos de lenguaje y el control motor (Fuster, 2015; Miller & Wallis, 2013).

En particular, la relación entre la regulación de la conducta social y la CPF se ha planteado a partir de múltiples estudios de lesión (S. W. Anderson *et al.*, 1999; Jenkins *et al.*, 2014; Kolb, 1974; Milne & Grafman, 2001; Schneider & Koch, 2005; Yang & Raine, 2009). En estos estudios, los pacientes con lesión unilateral de la COF del lado derecho se ven afectados en la conducta social, la toma de decisiones, el procesamiento emocional y la personalidad (Yang & Raine, 2009). Por otra parte, pacientes con lesión en la CPFVM tuvieron un pobre desempeño en la tarea de reconocimiento de emociones faciales y aquellos con lesión en la CPFDL en mediciones de empatía, mientras que ambos presentaron deficiencia en la medición de la Teoría de la Mente (ToM), es decir el entendimiento de los pensamientos e intenciones de los demás (Jenkins *et al.*, 2014). Por su parte, estudios en ratas con lesión orbitofrontal mostraron mayor agresividad en pruebas de agresión macho-macho y agresión inducida por *shock* (Kolb, 1974), así como déficits en conductas sociales y de juego (Kolb, 1974; Uylings *et al.*, 2003).

De igual modo, se ha postulado la participación de prácticamente todas las áreas de la CPF en el control de las emociones (Dixon *et al.*, 2017), no obstante, se atribuye la mayor participación en éste proceso a la COF y la región ventral de la CPF (Davidson, 2016). Lo anterior debido a los hallazgos en algunos de los trastornos del ánimo más conocidos como son la depresión y el trastorno bipolar. Por ejemplo, estudios en pacientes deprimidos encontraron anomalías en la activación de la región orbital y media de la CPF (Drevets, 2000), así como una disminución generalizada del tamaño neuronal de ésta misma corteza (Cotter *et al.*, 2005). En cambio, pacientes con bipolaridad presentaron disminución del tamaño neuronal

solamente en la COF (Cotter *et al.*, 2005). De igual manera, a través de estudios de neuroimagen, se ha encontrado que la integridad de la materia blanca y la conectividad funcional entre la amígdala y la CPFVL son factores determinantes en el desarrollo del trastorno bipolar (Strakowski *et al.*, 2012; Womer *et al.*, 2009). De manera similar, se ha relacionado la presencia de anomalías o daño en estas mismas regiones, COF y CPFVL, con la falta de control de la impulsividad y la hipomanía respectivamente (Davidson, 2016; Strakowski *et al.*, 2012).

Finalmente, la CPF ha sido considerada la estructura clave para el desempeño de las así llamadas “funciones ejecutivas”, es decir, la habilidad para organizar una secuencia de acciones para lograr un objetivo (Funahashi & Andreau, 2013; Fuster, 2015). A pesar de que la definición de función ejecutiva llega a ser distinta entre una investigación y otra, algunas características comunes se encuentran presentes. Entre las características comunes de las funciones ejecutivas encontramos el control de la atención, la organización temporal de las acciones, la planeación o programación de tareas para lograr un objetivo futuro, la capacidad para acceder y manipular información almacenada en la memoria de largo plazo, y el monitoreo del estado interno y externo actual. Cada una de éstas funciones se encuentra compuesta de múltiples sub-funciones, cada una de las cuales es mediada por una o más de las áreas de la CPF (Funahashi & Andreau, 2013). Dichas funciones han sido ampliamente relacionadas con el funcionamiento de la CPF tanto a través de estudios en humanos como en animales (Barbas & Zikopoulos, 2007; Dalley *et al.*, 2004; Delatour & Gisquet-Verrier, 2000; Euston *et al.*, 2012; Fiske & Holmboe, 2019; Funahashi & Andreau, 2013; Fuster, 2015; Kesner, 2000; Olton *et al.*, 1988; Yuan & Raz, 2014).

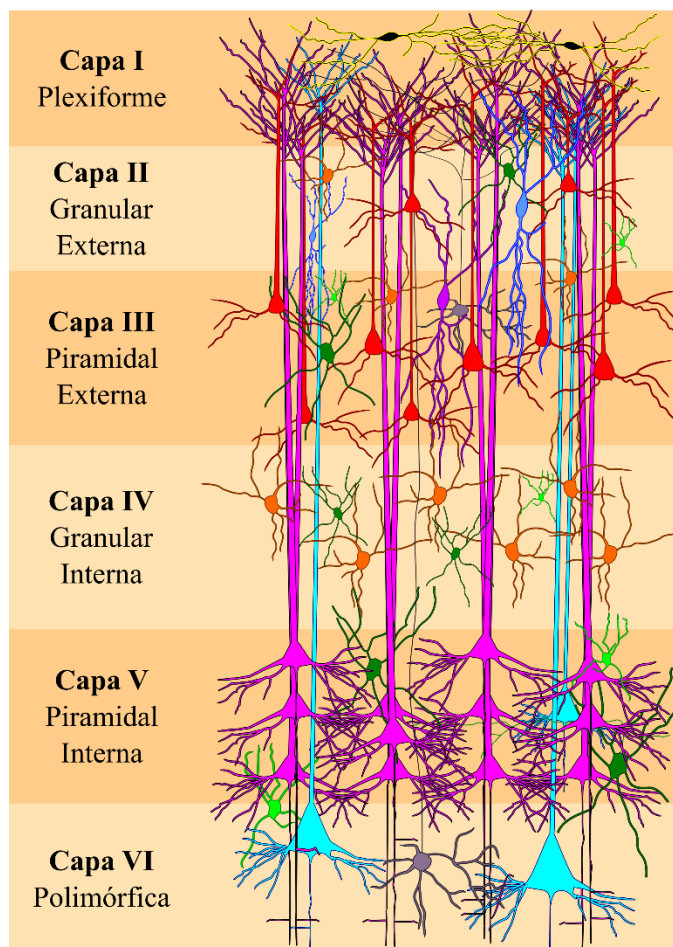
### 1.1.3 *Arquitectura y Composición celular*

De acuerdo a su citoarquitectura la CPF se encuentra clasificada como parte del *Isocortex*, el cual, desde los estudios de Brodmann (Brodmann, 1909/2006) y Vogt (Judaš & Capanec, 2010) se ha caracterizado por la distribución laminar de sus células y proyecciones, siendo distribuidas en seis capas que para su estudio se organizan y numeran desde la superficie externa (cercana a la *pia madre*) a la sustancia blanca:

- **Capa I (molecular o plexiforme).** Está ocupada por algunas neuronas dispersas, principalmente gliales, y consiste principalmente de extensiones de dendritas apicales de las células localizadas más profundamente en la corteza y por axones que viajan a través de ésta capa o que forman conexiones en ella.

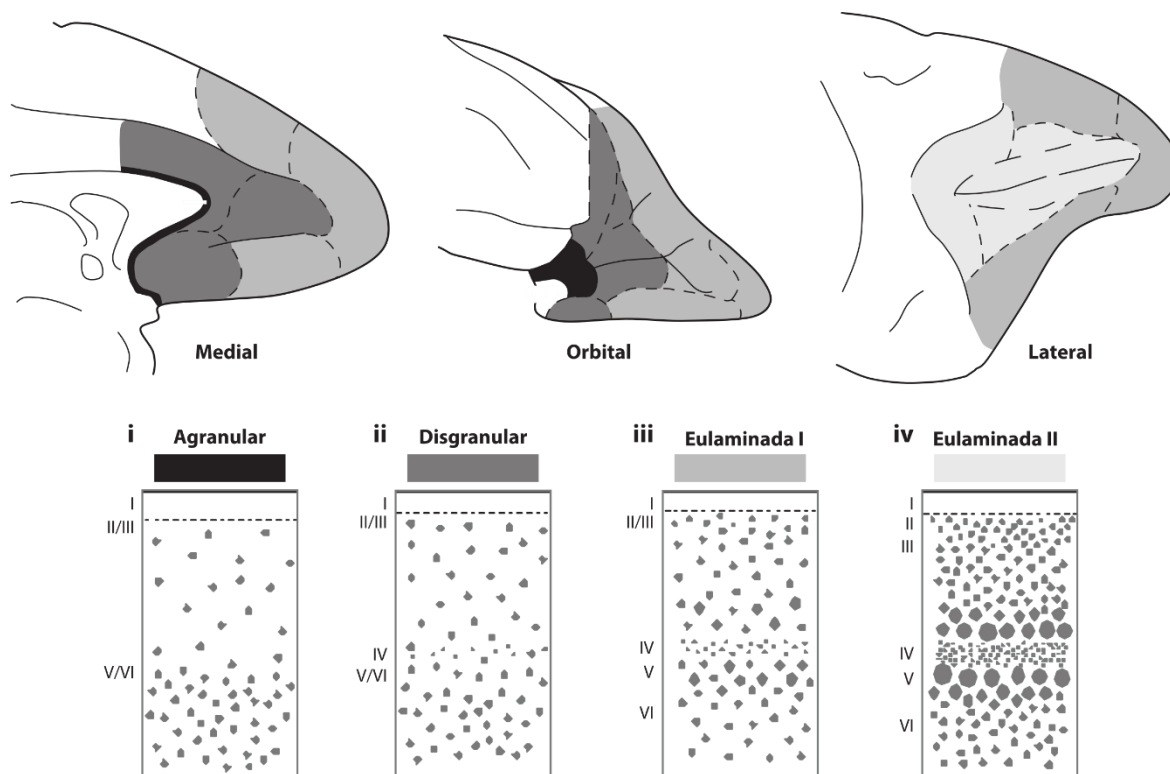
- **Capa II (granular externa).** Está compuesta principalmente por pequeñas células esféricas llamadas células granulares y contiene algunas células piramidales pequeñas que hacen conexión con otras áreas corticales del mismo hemisferio.
- **Capa III (piramidal externa).** De manera predominante contiene células piramidales pequeñas y medianas que establecen conexiones comisurales con el hemisferio opuesto, así como con cortezas de asociación dentro del mismo hemisferio, siendo así la principal fuente de eferentes corticales (en cortezas de cinco capas la mayoría de las proyecciones talámicas son a esta capa).
- **Capa IV (granular interna).** Del mismo modo que la capa II, se encuentra compuesta principalmente de células granulares, pero en este caso son principalmente interneuronas de circuito local (en cortezas de seis capas es la principal diana de la información sensorial que llega desde el tálamo).
- **Capa V (piramidal interna).** Contiene esencialmente células piramidales típicamente mayores que las de la capa III. Es la principal fuente de eferentes hacia gran número de zonas subcorticales.
- **Capa VI (polimórfica o multiforme).** Es una capa de neuronas bastante heterogénea. Se difumina dentro de la sustancia blanca que forma el límite inferior de la corteza y también es una capa de salida de la corteza. La mayoría de sus proyecciones son al tálamo

Como parte de esta organización, las capas I, II y III, las cuales comparten la característica de contener células involucradas en la conectividad cortico-cortical, han sido combinadas bajo el término de *capas supragranulares*, mientras que las capas profundas (V y VI), caracterizadas por su conectividad cortico-subcortical, constituyen las *capas infragranulares* (García-Cabezas & Zikopoulos, 2019; Palomero-Gallagher & Zilles, 2015). Aunado a esto, cabe denotar que las capas supragranulares contienen las dendritas apicales de neuronas localizadas en las capas infragranulares, mientras que las capas infragranulares contienen las dendritas basales de neuronas situadas en capas III y IV (García-Cabezas & Zikopoulos, 2019).



*Figura 3: Representación gráfica de las capas de la CPF. Puede observarse que la capa I consiste en dendritas y axones de células localizadas en capas inferiores, mientras que la capa II y III está formada por principalmente por células piramidales de pequeño tamaño y células granulares, las cuales extienden su presencia hasta la Capa IV. Por otra parte, las capas V y VI son las que contienen los somas de las neuronas piramidales de mayor tamaño. (Brodmann, 1909/2006)*

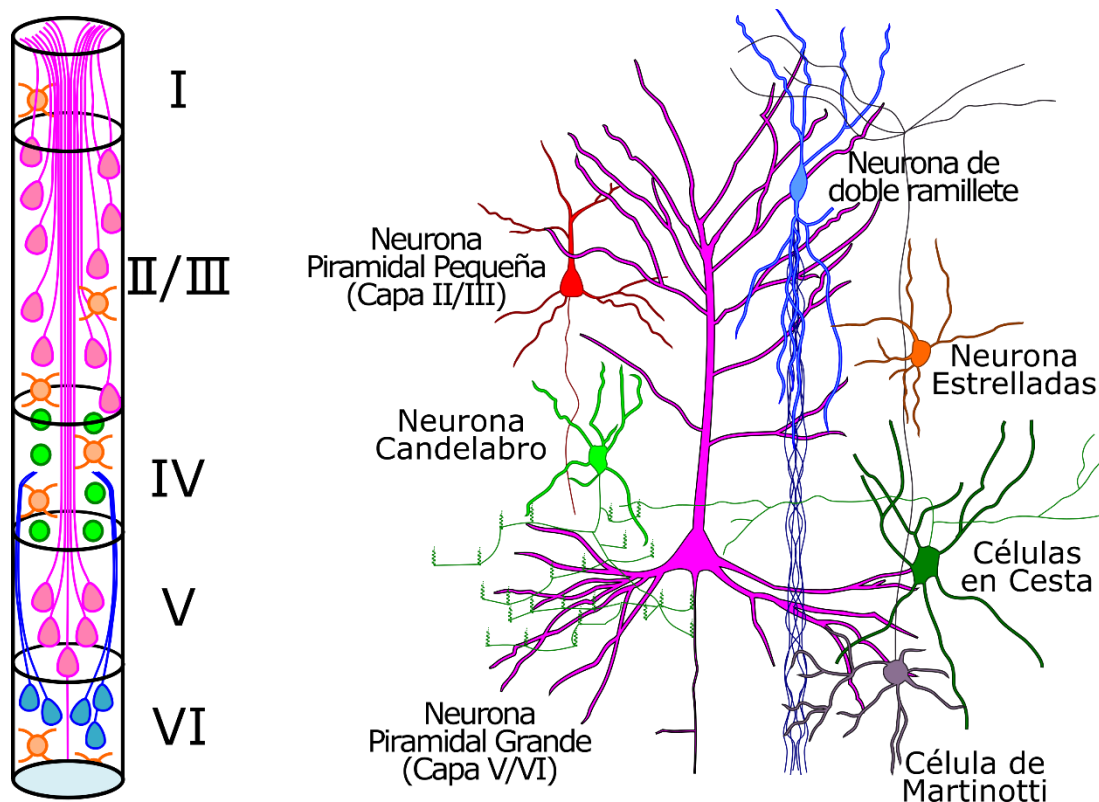
No obstante a la heterogeneidad arquitectónica en el *Isocortex*, en la CPF de primates existe variación en el grosor, principalmente, de la capa IV, pudiendo encontrarse desde regiones *agranulares* (sin corteza granular interna) hasta cortezas eulaminadas (con seis capas definidas), lo cual, se ha postulado, obedece a una variación sistemática (Barbas, 2015; Goulas *et al.*, 2018). Al respecto, cabe señalar que en la rata las regiones correspondientes a la CPF son *agranulares*, es decir carecen casi por completo de una capa IV diferenciada, e incluso, de manera general a pesar de existir también una estructura laminar, ésta se encuentra menos diferenciada que en los primates (Vogt, 2015).



**Figura 4:** Variación sistemática en las estructuras corticales. Representación de las vistas medial, orbital y lateral del cerebro de mono Rhesus en las cuales se denota en gama de grises la complejidad de la organización cortical (entre más claro mayor la complejidad). Los tonos de gris se correlacionan con la ilustración de las organizaciones corticales agranular (i, negro), disgranular (ii, gris oscuro), eulaminada I (iii, gris medio) y eulaminada II (iv, gris claro), donde se muestra el número de capas y complejidad de las mismas (Modificado de Barbas, 2015).

Aunado a la distribución laminar (en capas), la interconexión estructurada entre las capas en forma de “circuitos locales” juega un papel importante en la expresión de las funciones de la CPF (Opris *et al.*, 2017). Ya desde 1938, el científico español Rafael Lorente de Nó introdujo el concepto de “unidades elementales de operación corticales”, tras describir secciones verticales cilíndricas a lo largo de prácticamente las seis capas, que contenían “cadenas” verticales de neuronas, agrupadas alrededor de una fibra aferente como eje (Lorente de Nó, 1938). Los cilindros verticales similares a los descritos por Lorente de Nó, posteriormente fueron identificados y denominados minicolumnas (Mountcastle, 1957, 1997), no obstante, dicho termino hasta la fecha no cuenta con una definición y caracterización generalizada, por lo cual es utilizada para describir desde ramilletes de dendritas apicales hasta columnas de células (DeFelipe *et al.*, 2012; Rockland & Ichinohe, 2004).

La distribución columnar permite una interconexión a lo largo de todas las capas formando un circuito local o modulo funcional en el cual la capa IV, principal diana de las aferentes talámicas, recibe la información sensorial, la cual es integrada y asociada en las capas supragranulares para posteriormente ser ejecutada/transferida a otras cortezas a través de las neuronas piramidales de las capas infragranulares (Opris *et al.*, 2017).



*Figura 5: Ilustración representativa de la organización de una columna de la CPF (Izquierda) y los tipos celulares más representativos que la conforman (Derecha). Una minicolumna suele estar formada por una cadena de neuronas piramidales de las capas profundas, rodeadas por grupos de diversas interneuronas inhibitorias y pequeñas neuronas piramidales de las capas II y III (Modificado de Jones, 2000).*

En la CPF una minicolumna suele estar formada por una cadena de neuronas piramidales (pequeñas neuronas piramidales de las capas superiores que forman conexiones verticales con neuronas piramidales de mayor tamaño de las capas profundas) rodeadas por grupos de diversas interneuronas inhibitorias (Gabbott *et al.*, 1997, 2005; Gentet, 2012; Raghanti *et al.*, 2010). Éstas agrupaciones, se ha demostrado que proveen el balance entre inhibición y excitación, así como la especificidad temporal de los patrones de disparo entre las capas II/III y V que juega un papel causal en el ciclo percepción-acción, el cual permite integrar información relevante sobre el medio ambiente para entonces seleccionar y ejecutar las respuestas conductuales adecuadas (Opris *et al.*, 2012, 2013). Además, investigaciones recientes sugieren que las habilidades ejecutivas emergen de la interacción cortico-cortical entre los microcircuitos

interlaminares de la corteza prefrontal y que su alteración se encuentra involucrada en un amplio espectro de trastornos neurológicos y psiquiátricos tales como el autismo, la esquizofrenia, el Alzheimer y la drogadicción (Opris & Casanova, 2014).

Así, puede denotarse que la CPF se encuentra poblada principalmente por dos tipos neuronales, interneuronas, las cuales son principalmente GABAérgicas, representando el 15-25% de la población total y el control local inhibitorio; y, mayoritariamente, neuronas piramidales (75-80 % del total), las cuales son glutamatérgicas (Hevner, 2006).

A pesar de representar una minoría respecto a la población total de neuronas, las interneuronas GABAérgicas cuentan con una gran heterogeneidad, pudiendo estimarse a la fecha hasta 50 subtipos distintos (Lim *et al.*, 2018) los cuales se encuentran con una gran interconexión entre ellos (Ährlund-Richter *et al.*, 2019). Anatómicamente, las interneuronas GABAérgicas muestran una diversidad de morfologías somáticas, dendríticas y axonales, así como especificidad en los dominios subcelulares de los que son objetivo sus axones, incluso difieren en su conectividad entre un subtipo y otro (Tremblay *et al.*, 2016). No obstante, la identificación de ciertos marcadores ha servido de punto de inicio para la caracterización y clasificación de éste vasto grupo neuronal (Ährlund-Richter *et al.*, 2019; Lim *et al.*, 2018; Tremblay *et al.*, 2016). Estos marcadores incluyen la proteína de unión al calcio parvalbúmina (PV), el neuropéptido somatostatina (Sst) y el receptor ionotrópico de serotonina 5HT<sub>3A</sub> (5HT<sub>3AR</sub>), los cuales se expresan en grandes poblaciones de interneuronas no superpuestas (Tremblay *et al.*, 2016):

- a) Grupo PV: Son el grupo más grande, alrededor del 40% de las interneuronas. Incluye a las neuronas de candelabro (caracterizadas por sus singulares terminales sinápticas en forma de velas) y las células en cesta (identificables por formar “redes” de terminales perisomática alrededor del soma y dendritas proximales de las neuronas piramidales y otras interneuronas). De éstas, las primeras se encuentran principalmente en las capas II y VI, mientras que las segundas pueden encontrarse en cualquier punto desde la capa II hasta la V, siendo más prominentes en las capas IV y V. Un tercer tipo mucho menos estudiado son las células multipolares de disparo en ráfaga, las cuales se encuentran principalmente en el área superior de la capa II.
- b) Grupo Sst: Representando aproximadamente un 30% del total de interneuronas, constituye un grupo más diverso morfológicamente hablando, sin embargo, puede ser dividido a grandes rasgos en células de Martinotti y células no-Martinotti. De estos subgrupos, el primero se caracteriza por que envían sus axones hacia la capa I y su soma puede ser encontrado en cualquier capa desde la II hasta la VI, no obstante, son mucho más abundantes en la capa V. Por otra parte, las células no-

Martinotti son multipolares o de doble racimo, carecen de un plexo axonal significativo en la capa I y son más comunes en las capas IV y V.

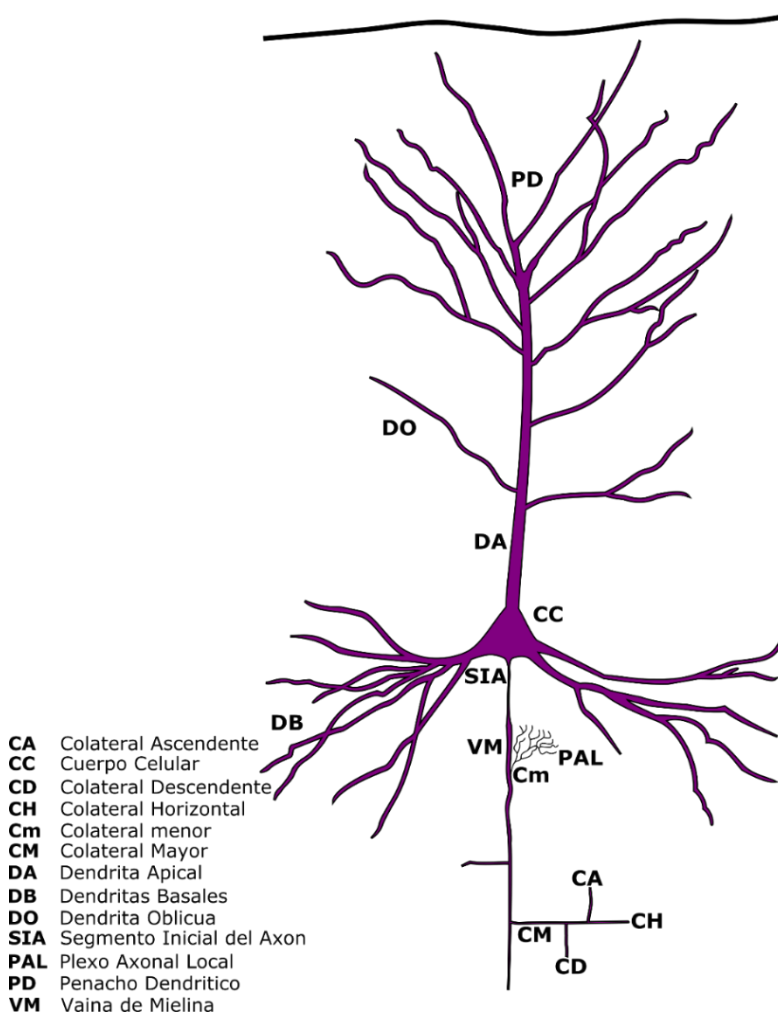
- c) Grupo 5HT<sub>3A</sub>R: Con un porcentaje similar al del grupo Sst, son el grupo más heterogéneo con morfologías desde multipolares hasta bipolares, incluyendo las de doble racimo y las glioformes. Este grupo de interneuronas se encuentra localizada de manera casi exclusiva en las capas supragranulares. Además, de la expresión del receptor 5-HT<sub>3</sub>, una gran proporción de estas interneuronas expresa péptido vasoactivo intestinal (Vip), por lo que puede dividirse en dos grupos, las que expresan Vip (≈60% del grupo) y las que no (≈40% del grupo), siendo las primeras frecuentemente encontradas en las capas II y III, mientras que las segundas, son las interneuronas más comunes en la capa I.

Sin embargo, éstos grupos aún muestran gran variabilidad respecto a sus propiedades funcionales y patrón de expresión de genes, por lo que su identificación con dichos marcadores debe considerarse solamente un primer nivel en su clasificación (Ährlund-Richter *et al.*, 2019; Lim *et al.*, 2018; Tremblay *et al.*, 2016). Cabe resaltar que además de los marcadores previamente expuestos, otros marcadores han sido ampliamente usados, como la reelina, las proteínas de unión al calcio calbindina y calretinina, así como el neuropéptido colecistoquinina y el neuropéptido Y, sin embargo, estos no se encuentran expresados en poblaciones no superpuestas, por lo cual se recomienda su uso para describir subpoblaciones, pero no para una identificación inicial (Tremblay *et al.*, 2016).

Por su parte, las neuronas piramidales son neuronas de proyección comúnmente divididas de acuerdo a su sitio de proyección (Baker *et al.*, 2018; DeFelipe & Fariñas, 1992; Kawaguchi, 2017). Éstas neuronas son un grupo heterogéneo con respecto al tamaño y forma de su soma, árbol dendrítico, densidad de espinas y sitios de proyección; lo cual dificulta el realizar una definición o descripción simples de una neurona piramidal arquetípica (DeFelipe & Fariñas, 1992) a pesar de que diversos intentos se han realizado de subclasificarlas de acuerdo a características moleculares (Baker *et al.*, 2018; Molnár & Cheung, 2006), morfológicas y electrofisiológicas (van Aerde & Feldmeyer, 2015). No obstante, por simplicidad, pueden ser divididas en típicas y atípicas.

Las neuronas piramidales típicas presentan un soma piramidal u ovoide en cuyo polo superior surge una dendrita apical prominente en dirección a la *pia madre* y presenta diversas ramificaciones oblicuas a ella. Por otra parte, desde su base emerge un sistema de dendritas basales largas direccionadas de manera lateral o hacia abajo y frecuentemente pueden observarse dendritas que surgen desde el soma orientadas de manera horizontal. De manera general, la dendrita apical alcanza la capa I, donde forma un “penacho”

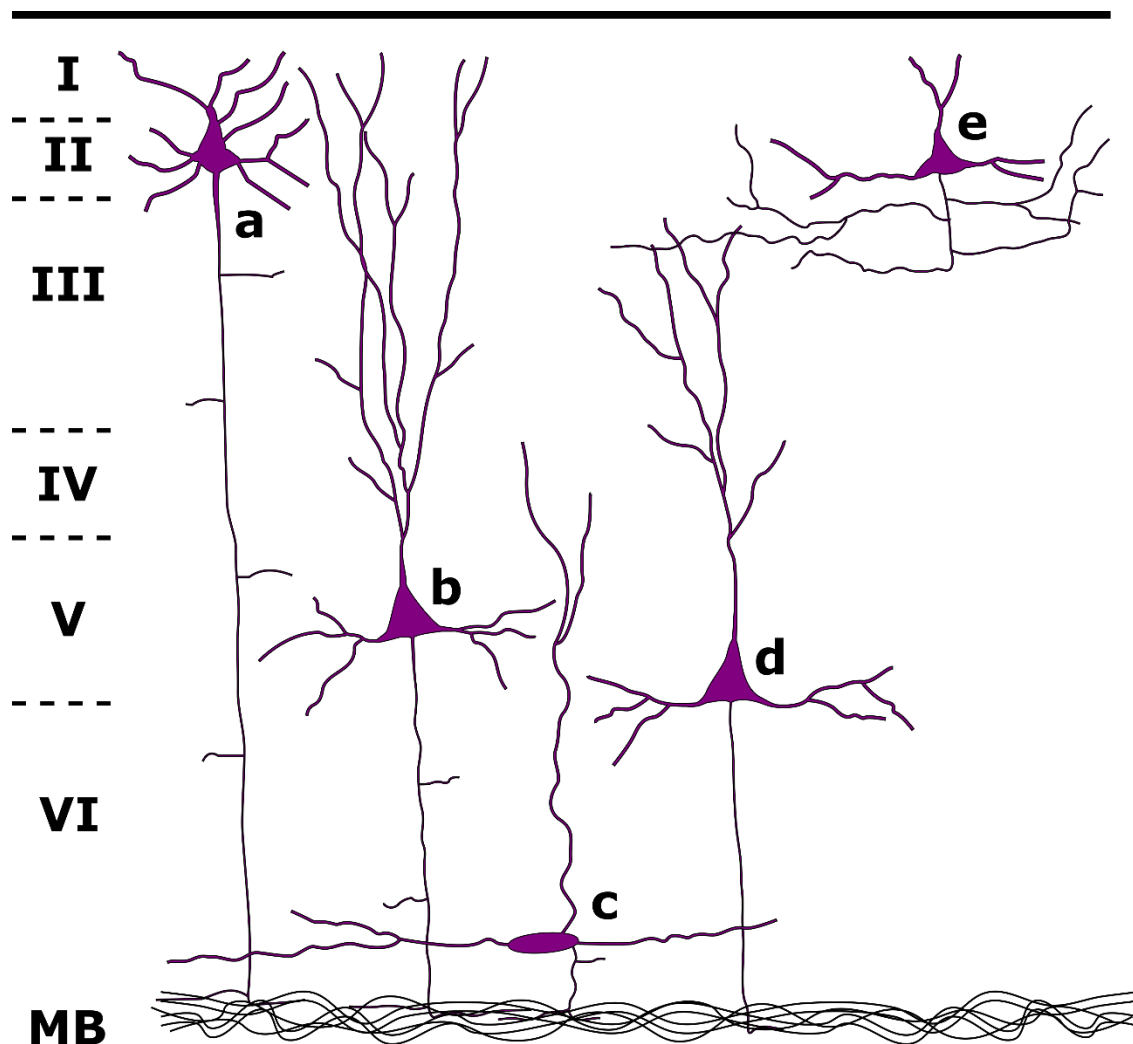
de ramificaciones, por tanto, la longitud de la dendrita apical depende de la profundidad en que se encuentre el soma. Sin embargo, existen muchas excepciones a esto último, por ejemplo, la dendrita apical de la mayoría de las neuronas piramidales encontradas en la capa VI y algunas de la capa V, no alcanzan la capa I. Por último, el axón se origina de la base de la neurona o del surge próxima a alguna dendrita basal y crece hacia abajo hasta dejar la corteza terminando en otra región cortical o subcortical (DeFelipe & Fariñas, 1992).



**Figura 6:** Diagrama esquemático que muestra una neurona piramidal típica y sus principales características. Su cuerpo celular es ovoide o piramidal de cuyo polo superior surge una dendrita apical prominente terminado en un "penacho" de ramificaciones. Desde su base emerge un sistema de dendritas basales largas direccionadas de manera lateral o hacia abajo. Por último, el axón se origina de la base de la neurona creciendo hacia abajo y con una serie de colaterales de distintos tamaños. (Modificado de DeFelipe & Fariñas, 1992)

Por otra parte, las neuronas piramidales atípicas son consideradas así debido a las características especiales de su patrón de ramas dendríticas, la forma de su soma, o su axón. Los ejemplos más comunes de éstas se enumeran a continuación (DeFelipe & Fariñas, 1992):

- a) Neuronas piramidales modificadas de la capa II, las cuales tienen una dendrita apical corta y forma muy similar a las neuronas estrelladas
- b) Neuronas piramidales con múltiples dendritas apicales
- c) Neuronas piramidales modificadas de capas infragranulares, cuyos somas muestran una gran variedad de formas (ovoides, triangulares o fusiformes) y no puede distinguirse en ellas una clara dendrita apical (por su grosor o direccionalidad)
  - i. Neuronas piramidales invertidas (el tronco de su dendrita apical se dirige hacia la materia blanca. Se encuentran principalmente en capa V y VI).
  - ii. Neuronas piramidales horizontales (su eje dendrítico se encuentra orientado de manera horizontal).
  - iii. Neuronas fusiformes horizontales y verticales (también llamadas bipolares profundas).
- d) Neuronas piramidales de proyección “pura”. Estas se encuentran desprovistas de colaterales axonales intracorticales
- e) Neuronas piramidales intracorticales, las cuales son pequeñas neuronas cuyos axones no abandonan la corteza.



*Figura 7: Ilustración de las distintas neuronas piramidales atípicas: a) Neuronas piramidales modificadas de la capa II, b) Neuronas piramidales con múltiples dendritas apicales, c) Neuronas piramidales modificadas de capas infragranulares, d) Neuronas piramidales de proyección "pura" e) Neuronas piramidales intracorticales (Modificado de DeFelipe & Fariñas, 1992).*

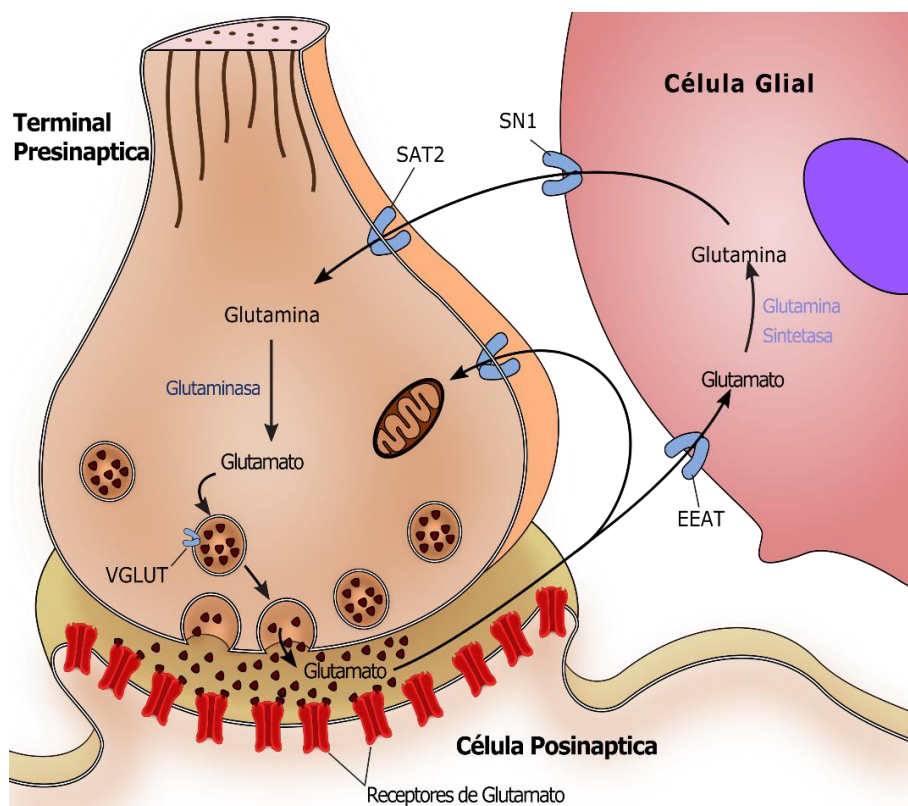
## 1.2 Transmisión Glutamatérgica

### 1.2.1 Glutamato

Las señales excitatorias glutamatérgicas representan la inmensa mayoría de las sinapsis en el cerebro lo cual es patente dado el gran número de neuronas piramidales y la alta concentración del glutamato encontrada a través de todo el sistema nervioso, principalmente en la CPF (Fuster, 2015; von Bohlen und Halbach & Dermietzel, 2006).

El glutamato es un aminoácido excitatorio el cual es producido a partir del  $\alpha$ -acetoglutarato, un intermediario en el ciclo de Krebs. Posteriormente a su liberación, es capturado en la hendidura sináptica por transportadores específicos en la membrana tanto de las neuronas como la glía. El glutamato capturado por los astrocitos es convertido a glutamina por la enzima glutamina sintetasa y después difundida de nuevo dentro de las neuronas piramidales donde es hidrolizada de nuevo a glutamato. Debido a lo anterior, la interacción entre las células gliales y las neuronas excitatorias juega un papel importante en la disponibilidad y regulación del glutamato (Broman *et al.*, 2000; Kandel *et al.*, 2012).

Tras la despolarización de la terminal nerviosa que contiene al glutamato, este es liberado en la hendidura sináptica en una forma dependiente de calcio, ejecutando su acción excitatoria a través de dos amplias categorías de receptores: los receptores ionotrópicos, los cuales activan directamente a canales iónicos y los metabotrópicos que se activan de manera indirecta ya que se acoplan con segundos mensajeros a través de un sistema de proteínas G (Puil & Benjamin, 1988; von Bohlen und Halbach & Dermietzel, 2006).



**Figura 8:** Síntesis y reciclado del glutamato entre neuronas y células gliales. La acción del glutamato liberado en la hendidura sináptica concluye cuando es captado por las neuronas y las células gliales circundantes mediante transportadores específicos. Dentro de la terminación nerviosa la glutamina liberada por las células gliales y captada por las neuronas es convertida nuevamente en glutamato. El glutamato es transportado dentro de las células a través de transportadores de aminoácidos excitadores (EEAT) y posteriormente mediante transportadores vesiculares de glutamato (VGLUT) es cargado en vesículas (Modificado de Purves *et al.*, 2017).

### 1.2.2 Receptores Ionotrópicos de Glutamato

Existen tres principales subtipos de receptores a glutamato ionotrópicos: AMPA, Kainato (KA) y NMDA, nombrados de acuerdo a los agonistas sintéticos que los activan ( $\alpha$ -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato, kainato y N-metil-D-aspartato, respectivamente). Estos tres receptores son canales catiónicos no selectivos, que permiten principalmente el paso de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , así como  $\text{Ca}^{2+}$  en algunos casos, generando su activación respuestas postsinápticas excitatorias (Purves *et al.*, 2017; von Bohlen und Halbach & Dermietzel, 2006).

La activación de los receptores tipo AMPA provoca una apertura rápida de su canal, el cual es permeable a  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , además de  $\text{Ca}^{2+}$  de forma dependiente a sus subunidades. Además, cuenta con un potencial de reversión alrededor de 0 mV. Los receptores tipo AMPA tienen una conductancia de canal único relativamente pequeña y una cinética rápida, del mismo modo que su desensibilización. Su afinidad por el agonista endógeno L-Glutamato es relativamente baja (comparada con el receptor tipo NMDA) con una concentración efectiva 50 ( $\text{EC}_{50}$ ) de  $\approx 0.5$  mM. Dado lo anterior, sus propiedades biofísicas dan como resultado una corriente macroscópica transitoria rápida (Ashby *et al.*, 2008; von Bohlen und Halbach & Dermietzel, 2006).

Los receptores AMPA se encuentran formados por heterotetrámeros compuestos por dímeros simétricos de las subunidades GluA1, GluA2, GluA3 y GluA4 (Ashby *et al.*, 2008; Bettler *et al.*, 2019). De éstas subunidades, las neuronas piramidales en la corteza cerebral del adulto, expresan de manera predominante la GluA1 y GluA2, por lo que la principal combinación heteromérica resultante es la GluA1/GluA2 (Ashby *et al.*, 2008). La subunidad GluA1 cuenta con un sitio de fosforilación (serina 831), el cual al ser fosforilado por la proteína quinasa C (PKC) o la proteína cinasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina II (CaMKII), causa que el receptor AMPA se abra en un estado de alta conductancia, incrementando la conductancia efectiva en alrededor de un 50% (Ashby *et al.*, 2008; Lisman *et al.*, 2002). Por otra parte, GluA2 es la subunidad dominante al determinar las propiedades biofísicas del receptor AMPA, por ejemplo, los canales que contienen esta subunidad cuentan con una relación lineal entre corriente y voltaje, además de ser impermeables al  $\text{Ca}^{2+}$ , a comparación de aquellos en que no se encuentra presente. Sin embargo, dada la alta predominancia de la subunidad GluA2 en las neuronas de manera postnatal, la mayoría de los receptores AMPA son impermeables al  $\text{Ca}^{2+}$  (Ashby *et al.*, 2008).

Por su parte, los receptores de glutamato tipo KA guardan muchas similitudes de función con los del tipo AMPA, en tanto que su activación provoca una corriente entrante de rápida activación y rápida desensibilización. A potenciales hiperpolarizantes la corriente de éstos receptores es en gran medida de

Na<sup>+</sup>, no obstante, algunos receptores de tipo KA son permeables también al Ca<sup>2+</sup>, de manera dependiente a sus subunidades (Contractor & Swanson, 2008; Stefani *et al.*, 1998).

La función precisa de los receptores tipo KA no ha sido clarificada en detalle. Se ha mostrado que los sitios de unión de alta afinidad a KA se localizan preferentemente en las membranas presinápticas, por lo tanto, éstos receptores han sido involucrados principalmente en la modulación de la liberación de glutamato, no obstante, también son encontrados de manera postsináptica en una gran diversidad de tipos neuronales (Purves *et al.*, 2017; von Bohlen und Halbach & Dermietzel, 2006).

En lo que respecta a las subunidades de los receptores tipo KA, aquellos que son funcionales pueden ser expresados como homómeros o heterómeros de las subunidades GluK1, GluK2 o GluK3. Dos subunidades adicionales pueden ser encontradas, la GluK4 y GluK5, sin embargo, cuando éstas son expresadas individualmente forman sitios de unión muy fuertes para el KA, pero son carentes de función. A pesar de lo anterior, cuando GluK4 y GluK5 forman heterómeros con las subunidades GluK1-3, éstas subunidades contribuyen en las propiedades biofísicas del receptor por ejemplo al enlentecer de su tiempo de desensibilización (Bettler *et al.*, 2019; Contractor & Swanson, 2008). Por otra parte, se ha demostrado que el canal iónico activado por glutamato de tipo kainato puede además unirse a proteínas G modulando de manera metabotrópica la liberación de Glutamato o GABA, lo que incrementa la complejidad para el entendimiento de su función (Contractor & Swanson, 2008; Cunha *et al.*, 1999; Negrete-Díaz *et al.*, 2018; Rodrigues & Lerma, 2012)

Finalmente, comparado con los receptores AMPA y KA, los receptores NMDA se unen al glutamato con mayor afinidad y el tiempo de ascenso para sus corrientes son mucho más lentos. Además, se inactiva con un curso de tiempo mucho mayor que el curso de tiempo del glutamato en la mayoría de las hendiduras sinápticas. Por tanto, durante la transmisión sináptica los receptores de glutamato no-NMDA (AMPA y KA) proveen una despolarización rápida en respuesta a la liberación del neurotransmisor, y la cinética del receptor NMDA determina la duración de la corriente sináptica (Petralia & Wenthold, 2008; Zito & Scheuss, 2009).

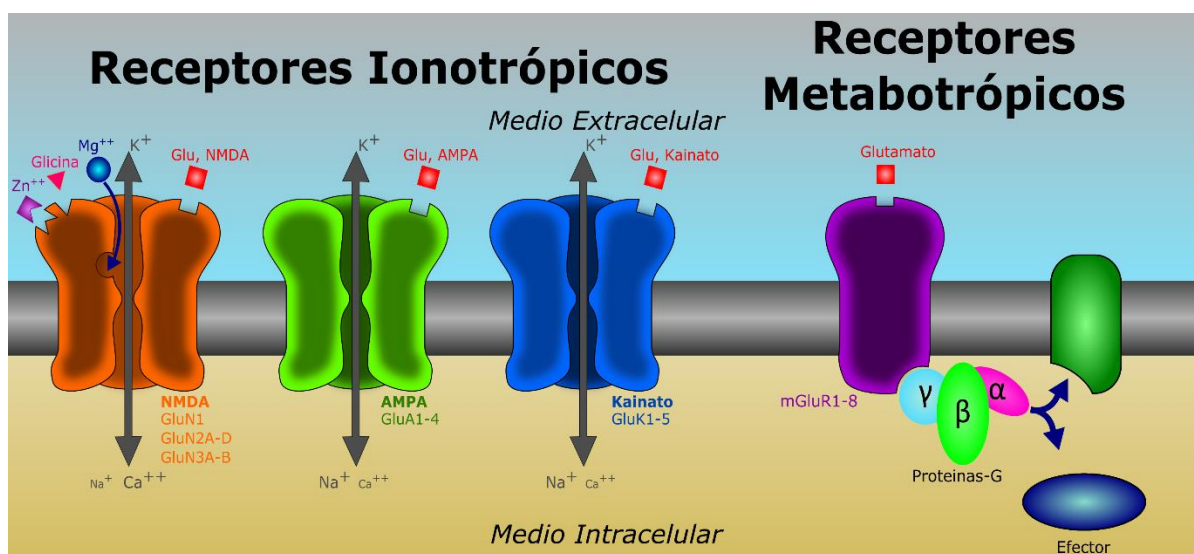
Lo anterior se debe a que los receptores NMDA tienen propiedades fisiológicas que lo separan de los otros receptores a glutamato. La primera característica y quizás la más significativa, es que el poro del canal del receptor NMDA además de ser permeable a Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, es altamente permeable a Ca<sup>2+</sup>. Como de esta alta permeabilidad, la concentración de Ca<sup>2+</sup> incrementan en la neurona postsináptica, lo que permite que el Ca<sup>2+</sup> actúe como segundo mensajero para activar procesos de señalización intracelular que promueven

cambios a largo plazo en la fuerza de la sinapsis y otras modificaciones celulares, incluyendo alteraciones en la estructura sináptica o la conectividad. La segunda propiedad biofísica clave del receptor NMDA, es su bloqueo por  $Mg^{2+}$  de manera voltaje dependiente. A un potencial de membrana en reposo los receptores NMDA permanecen bloqueados por  $Mg^{2+}$ , sin embargo, si la excitación causada por las entradas sinápticas es suficiente para despolarizar a la neurona, el bloqueo por  $Mg^{2+}$  es liberado y los receptores NMDA unidos a glutamato se abren. Por último, otra característica inusual del receptor NMDA es que su apertura requiere un coagonista, papel que se ha asignado de manera canónica la glicina, no obstante, muchas otras moléculas pueden actuar como coagonistas del receptor NMDA, por ejemplo, la D-serina y la D-alanina, entre otras (Chen *et al.*, 2008; Mori & Mishina, 1995; Petralia & Wenthold, 2008; Purves *et al.*, 2017; Zito & Scheuss, 2009)

Los receptores NMDA son tetrámeros ensamblados por tres grupos de subunidades (GluN1, GluN2 y GluN3) con un total de siete diferentes subtipos (GluN1, GluN2A, GluN2B, GluN2C, GluN2D, GluN3A y GluN3B; Bettler *et al.*, 2019). De éstos, las subunidades del grupo GluN2 se unen a glutamato, mientras que los grupos GluN1 y GluN3 se unen a glicina. Así, los tetrámeros del receptor NMDA generalmente se componen de dos subunidades con unión a Glutamato (GluN2) y dos subunidades con unión a glicina (GluN1), sin embargo, en algunos casos una subunidad GluN3 puede remplazar una de las dos subunidades GluN2. (Mori & Mishina, 1995; Purves *et al.*, 2017; Zito & Scheuss, 2009). Aunado a lo anterior, la combinación de subunidades que componen a cada receptor modifican sus características biofísicas alterando así la probabilidad de apertura del canal, la potencia del agonista, su cinética de inactivación y desensibilización, así como su sensibilidad al  $Ca^{2+}$  y moduladores endógenos tales como el  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  y las poliaminas (Cull-Candy *et al.*, 2001; Glasgow *et al.*, 2015; Paoletti *et al.*, 2013; Paoletti & Neyton, 2007; Vicini *et al.*, 1998).

Además de las diferencias en la cinética del receptor debidas a sus diferentes subunidades, la función del receptor NMDA es modificada mediante diversas formas de modulación alostérica que involucran sustancias extracelulares como  $Zn^{2+}$ , protones, poliaminas y agentes oxidantes y reductores. El  $Zn^{2+}$ , los protones y los agentes oxidantes inhiben la función de los receptores NMDA, mientras que las poliaminas y los agentes reductores causan los potencian al modificar la frecuencia y tiempo de apertura o la afinidad de los agonistas o moduladores. Además, el  $Zn^{2+}$  y las poliaminas median un bloqueo dependiente del voltaje de los receptores NMDA, que es más débil, pero parece implicar los mismos residuos intraporales que el bloqueo por el  $Mg^{2+}$  (Mori & Mishina, 1995; Petralia & Wenthold, 2008; Zito & Scheuss, 2009).

Por otro lado, en general la fosforilación aumenta la función del receptor NMDA. Se estima que un porcentaje significativo de subunidades de los receptores NMDA en el cerebro son fosforilados por PKC o por la proteína cinasa A (PKA) en uno o más sitios. La fosforilación por PKC reduce la afinidad por el  $Mg^{2+}$  extracelular e incrementa la probabilidad de apertura. Al respecto, cabe mencionar que la entrada misma de  $Ca^{2+}$  a través de los receptores NMDA puede aumentar la potenciación mediada por PKC. Por otra parte, la regulación del receptor NMDA por parte de PKA y CaMKII ha sido menos estudiada (Mori & Mishina, 1995; Petralia & Wenthold, 2008; Zito & Scheuss, 2009).



**Figura 9:** Receptores Ionotrópicos y metabotrópicos activados por glutamato. El glutamato ejerce su acción excitatoria a través de dos amplias categorías de receptores: los receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA y Kainato), los cuales activan directamente canales catiónicos no selectivos, que permiten el paso de  $Na^+$  y  $K^+$ , así como  $Ca^{2+}$  en algunos casos, y los receptores metabotrópicos (mGluR1-8) que ejercen su acción a través de un sistema de proteínas G (Gereau & Swanson, 2008).

### 1.3 Neuromodulación de la Corteza Prefrontal

La diversidad y complejidad de las tareas llevadas a cabo por la CPF no se debe únicamente a señales excitatorias e inhibitorias, sino también a la alta sensibilidad que tiene a su estado neuroquímico, modulado por las entradas ascendentes de grupos colinérgicos y monoaminérgicos del mesencéfalo, incluyendo la acetilcolina (ACh), la serotonina (5-HT), la dopamina (DA) y la noradrenalina (NA), a través de terminales originadas en el prosencéfalo basal (BF), el rafé dorsal y medial (NR), el área tegmental ventral (VTA) y el *locus caeruleus* (LC), respectivamente (de Bruin *et al.*, 1991; Dembrow & Johnston, 2014; Fuster, 2015; Santana & Artigas, 2017).

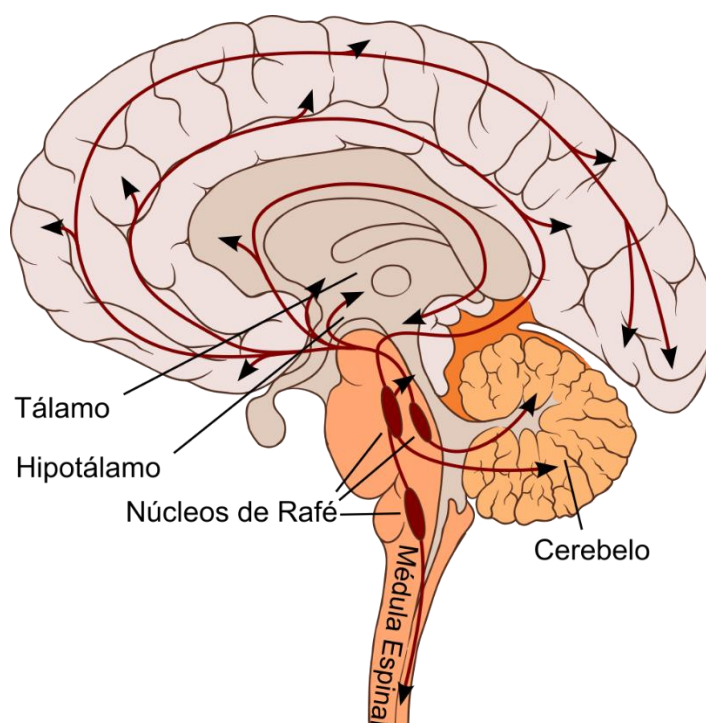
Dado el papel modulador de los anteriormente citados grupos colinérgicos y monoaminérgicos, es difícil atribuirles una función específica, sin embargo, se encuentran implicados en algunas funciones más que en otras, en virtud de su distribución en la CPF y de algunas restricciones relacionadas con el tipo celular, localización, concentración y conectividad. Por ejemplo, la acetilcolina ha sido implicada principalmente en procesos relacionados con la atención (Bloem *et al.*, 2014; Poorthuis *et al.*, 2013; Poorthuis & Mansvelder, 2013); la NE se ha vinculado con la memoria operativa, la concentración y el estrés, del mismo modo que la DA (Arnsten, 2009; Dash *et al.*, 2007; Rossetti & Carboni, 2005; Seamans & Yang, 2004; Zhang *et al.*, 2013), sin embargo, esta última también ha sido encontrada partícipe en la organización y ejecución de la conducta motora por parte de la CPF (Sawaguchi *et al.*, 1986), la conducta dirigida a objetivos (Hollerman *et al.*, 2000) y la motivación y recompensa Schultz *et al.*, 1997, 2000). Por otra parte, la 5-HT se ha encontrado que desempeña un papel en el control de la cognición y la memoria (Clark *et al.*, 2004; H. F. Clarke *et al.*, 2005; Park *et al.*, 1994), la flexibilidad (H. F. Clarke *et al.*, 2004, 2007) y el control de impulsos (Dalley *et al.*, 2002; Rogers, Blackshaw, *et al.*, 1999; Rogers, Owen, *et al.*, 1999), además de estar implicado en procesos relacionados a la conducta social (Crockett *et al.*, 2010; Kiser *et al.*, 2012; Moskowitz *et al.*, 2003).

### 1.3.1 Serotonina

#### 1.3.1.1 Generalidades

La 5-HT, cuyo nombre químico es 5-hidroxitriptamina, es una indolamina de amplia distribución en el cuerpo, principalmente en los sistemas, gastrointestinal, respiratorio y cardiovascular (Fuster, 2015). El cerebro contiene solamente el 1-2%, sin embargo en éste la 5-HT es prácticamente ubicua, regulando desde el control motor (Carey, 2010) hasta la conducta sexual (Uphouse & Guptarak, 2010), incluyendo el humor (Hensler, 2010), la conducta social (Duman & Canli, 2010) y la impulsividad (Robbins & Crockett, 2010), entre otros (Cassel, 2010; Lee & Clifton, 2010; Lowry & Hale, 2010; McBride, 2010; Sommer, 2010). Sin embargo, la 5-HT no atraviesa la barrera hemato-encefálica, por lo que el cerebro sintetiza la propia a partir del aminoácido triptófano gracias a la acción de dos enzimas: la triptófano hidroxilasa (TPH), que forma 5-hidroxitriptófano (5-HTP) a partir del triptófano y es responsable del paso limitante de la biosíntesis de la 5-HT y la L-Aminoácido aromático descarboxilasa (5-hidroxitriptófano descarboxilasa, AAAD) que descarboxila el 5-HTP a 5-HT, reacción que sucede rápidamente a medida que el precursor inmediato se encuentra disponible. Tanto el triptófano como el 5-HTP son capaces de atravesar la barrera hemato-encefálica (Brailowsky, 1995; Brunton *et al.*, 2007; Fuster, 2015; Kandel *et al.*, 2012).

Las neuronas serotoninérgicas se encuentran distribuidas cerca de la línea central del tallo cerebral a lo largo de toda su extensión rostro-caudal en nueve núcleos principales (B1 a B9) llamados Núcleos del Rafé (NR). Estos núcleos se agrupan en rostrales y caudales, que a su vez se sub-dividen en núcleo caudal lineal (CLi), rafé dorsal (DR) y núcleo del rafé medial (MnR); y núcleo del rafé *magnus* (RMg), *obscurus* (ROb) y *pallidus* (RPa) respectivamente. A partir de estos núcleos nacen fibras que llegan a prácticamente todo el sistema nervioso (ganglios basales, hipotálamo, tálamo, hipocampo, sistema límbico, corteza cerebral, cerebelo y médula espinal), siendo los rostrales los que proyectan a prácticamente todo el cerebro, mientras que los caudales envían sus fibras hacia las áreas del tallo cerebral y la médula (Hornung, 2003, 2010).



**Figura 10:** Sistema Serotoninérgico. Representación gráfica de la distribución de las terminales serotoninérgicas (flechas) a partir de los núcleos del rafé (óvalos rojos) a través del SNC (Hornung, 2010).

### 1.3.1.2 Receptores Serotoninérgicos

Las terminaciones eferentes de los NR inervan a prácticamente todo el cerebro, donde la 5-HT que liberan actúa a través de 13 distintos receptores, uno ionotrópico (5-HT<sub>3</sub>) y el resto metabotrópicos, los cuales pueden agruparse en función al tipo de proteína G a la que se acoplan. Los receptores asociados a G<sub>q/11</sub>, los miembros de la familia 5-HT<sub>2</sub> (5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>), relacionadas con la activación de la fosfolipasa C (PLC) y una tendencia a despolarizar la membrana celular y/o incrementar la excitabilidad del

compartimento celular en que se encuentran. La familia de receptores 5-HT<sub>1</sub> (5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>1E</sub> y 5-HT<sub>1F</sub>) y el 5-HT<sub>5</sub> (tanto 5-HT<sub>5A</sub> como 5-HT<sub>5B</sub>) se encuentra acoplada a G<sub>i/o</sub> cuya activación lleva a la inhibición de la adenilato ciclasa y la subsecuente disminución del AMP cíclico (cAMP) que desemboca en una reducción de la actividad neuronal o la hiperpolarización de la membrana a través de canales catiónicos activados por la hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos (canales HCN). Los receptores a 5-HT restantes (5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub> y 5-HT<sub>7</sub>) se encuentran asociados a proteínas G<sub>s</sub> y modulan de manera positiva la adenilato ciclasa que usualmente resulta en un efecto excitatorio directo (Barnes & Sharp, 1999; Heine *et al.*, 2002; Marek, 2010; Mengod *et al.*, 2010; Nichols & Nichols, 2008; Ponimaskin *et al.*, 2007).

#### 1.4 Modulación Serotoninérgica de la Corteza Prefrontal

De entre los anteriormente citados receptores a 5-HT, en la CPF se pueden encontrar principalmente a tres de ellos: el 5-HT<sub>3</sub>, el 5-HT<sub>1A</sub> y el 5-HT<sub>2A</sub>. El 5-HT<sub>3</sub>, se expresa fuertemente en las capas I – III, casi de manera exclusiva en interneuronas GABAérgicas y más específicamente en aquellas que expresan colecistoquinina o las proteínas de unión a calcio calbindina y calretinina. El receptor 5-HT<sub>1A</sub> cuya mayor expresión se da en las capas V y VI, tanto en interneuronas como en neuronas piramidales. Y el receptor 5-HT<sub>2A</sub>, el cual se expresa en interneuronas y neuronas piramidales principalmente de las capas III y V, y en menor medida en la capa VI. Principalmente en la capa V, pueden encontrarse dos poblaciones de interneuronas de disparo rápido que expresan parvalbúmina y receptores 5-HT<sub>1A</sub> o 5-HT<sub>2A</sub>, pero no ambos, en una proporción aproximada al 50%. En esta misma capa, alrededor del 60% de las neuronas piramidales expresan a los receptores 5-HT<sub>1A</sub> o 5-HT<sub>2A</sub>, co-expresando ambos receptores alrededor de un 80% de estas células (Celada *et al.*, 2013; Leiser *et al.*, 2015; Puig, Celada, *et al.*, 2004; Puig & Gullledge, 2011).

El efecto más claro de la 5-HT en la CPF es una inhibición causada por la activación del receptor 5-HT<sub>1A</sub> y a su aparente papel dominante en la regulación de la excitabilidad de las neuronas piramidales de esta área. La inhibición causada por el receptor 5-HT<sub>1A</sub> se debe a un aumento en la conductancia de K<sup>+</sup> y la subsecuente hiperpolarización de la membrana neuronal, la cual es mediada por activación de canales Kir3.x secundaria a la liberación de la subunidad βγ de la proteína G a que se encuentra unido el receptor (Andrade, 2011; Celada *et al.*, 2013; Puig, Celada, *et al.*, 2004; Puig, 2011; Puig & Gullledge, 2011). Además, el receptor 5-HT<sub>1A</sub> se encuentra también involucrado en la modulación de la neurotransmisión excitatoria

glutamatérgica dado que su activación suprime la señal mediada por AMPA a través de la inhibición de CAMKII y reduce las corrientes mediadas por NMDA reduciendo la estabilidad de los microtúbulos y el subsecuente tráfico de las subunidades del receptor NMDA a través de ellos (Cai *et al.*, 2002; Yuen *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2008)

Por otro lado, la activación del receptor 5-HT<sub>2A</sub>, reduce la conductancia a K<sup>+</sup> en reposo induciendo una lenta despolarización de la membrana por un incremento del Ca<sup>2+</sup> intracelular (lo cual incrementa las corrientes postsinápticas excitatorias). Sin embargo, la habilidad del receptor 5-HT<sub>2A</sub> para despolarizar las neuronas es limitada, y, normalmente, solo unos cuantos milivoltios de despolarización son observados, no obstante, la activación del receptor 5-HT<sub>2A</sub> puede aumentar la generación de potenciales de acción en respuesta a otras entradas excitatorias. Además de esto, uno de los mecanismos más importantes por el cual el receptor 5-HT<sub>2A</sub> incrementa la excitabilidad de las células piramidales parece estar mediada por la inhibición de la corriente de posthiperpolarización (IAHP) normalmente observada después de una ráfaga de picos. Como la posthiperpolarización (AHP) está implicada en la determinación de la excitabilidad neuronal, una inhibición de este tipo podría contribuir a regular la actividad de los patrones de disparo de las neuronas corticales (Andrade, 2011; Celada *et al.*, 2013; Puig, Celada, *et al.*, 2004; Puig, 2011; Puig & Gullledge, 2011).

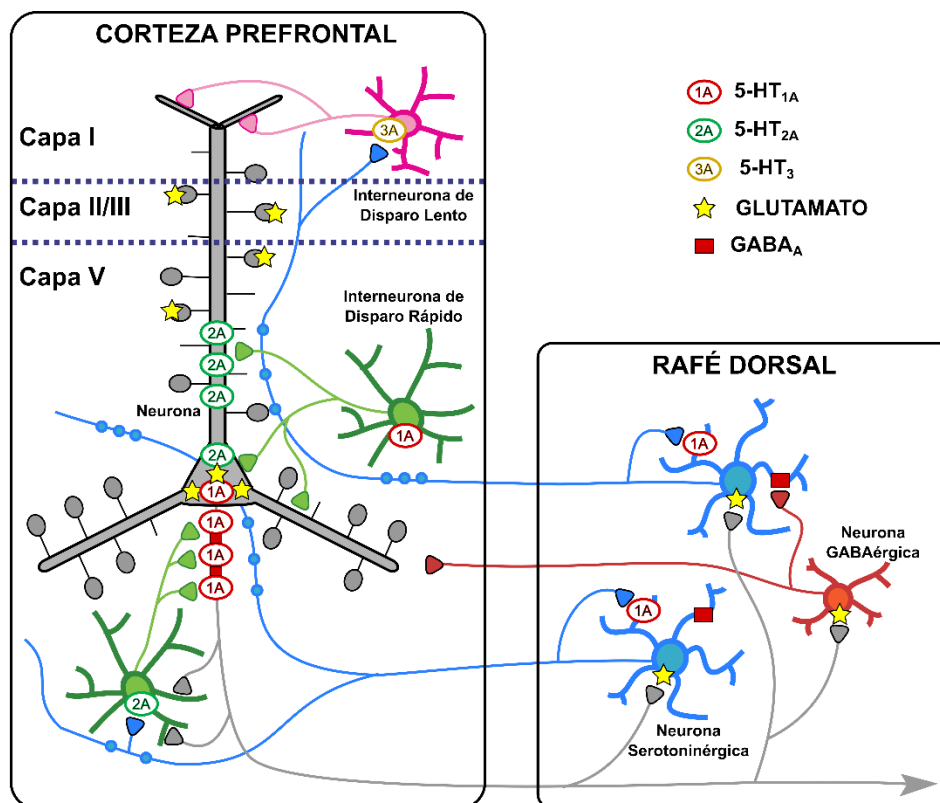
La administración local en la corteza media prefrontal de DOI (2, 5-dimetoxi-4-yodo-anfetamina), un agonista parcial de los receptores 5-HT<sub>2A/C</sub>, provoca un aumento en la liberación de 5-HT debido a la activación de los circuitos CPF-NR, el cual se revierte por un antagonista AMPA/KA y se reproduce por la perfusión de AMPA. Dicho aumento de 5-HT producido por DOI también puede revertirse a través de la reducción de la transmisión glutamatérgica mediante la aplicación local de agonistas de los receptores metabotrópicos del glutamato (mGluR) de las familias II/III, que inhiben presinápticamente la liberación de glutamato y postsinápticamente la actividad de las neuronas corticales. Asimismo, la liberación cortical de 5-HT también aumenta cuando se incrementan las concentraciones extracelulares de glutamato endógeno, ya sea bloqueando su recaptura o incrementando su liberación desde terminales talámicos tras la estimulación eléctrica del tálamo. Por otra parte, la activación del receptor 5-HT<sub>2A/C</sub> se opone a la habilidad del receptor 5-HT<sub>1A</sub> para despolimerizar los microtúbulos, sugiriendo que la dinámica microtubular y el transporte de las subunidades del receptor NMDA por los microtúbulos es regulada por los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A/C</sub> de manera opuesta. Estos resultados indican que existe una importante interacción entre la activación de receptores 5-HT<sub>2A</sub> corticales y la transmisión glutamatérgica de la CPF (Martín-Ruiz *et al.*, 2001; Puig, Celada, *et al.*, 2004; Yuen *et al.*, 2008; Zhong *et al.*, 2008).

Sin embargo, estudios *in vitro* indican que la activación de los receptores corticales 5-HT<sub>2A</sub> inducen efectos opuestos en las neuronas piramidales, y se registran tanto despolarizaciones como hiperpolarizaciones; estas últimas mediadas, muy probablemente, por la activación de receptores 5-HT<sub>2A</sub> localizados en interneuronas GABAérgicas de disparo rápido, que al activarse provocan corrientes postsinápticas inhibitorias (IPSC's). No obstante, la estimulación eléctrica de los NR, ejerce una potente supresión predominante de la actividad de las interneuronas de disparo rápido, similar a la observada en neuronas piramidales, la cual es mediada por el receptor 5-HT<sub>1A</sub> (Andrade, 2011; Celada *et al.*, 2013; Leiser *et al.*, 2015; Puig, Celada, *et al.*, 2004; Puig, 2011; Puig & Gullledge, 2011).

En el caso de las interneuronas de disparo lento, éstas posiblemente modulan la actividad piramidal a través de sus contactos con las dendritas apicales, lo cual, debido a la localización característica de los receptores 5-HT<sub>3</sub> (en un gradiente descendente desde la capa I a VI) se sugiere que son la diana del denso plexo de terminales serotoninérgicos que llegan a las capas superficiales de la corteza. Además, en el registro de neuronas GABAérgicas corticales realizados tanto *in vivo* como *in vitro*, se ha descrito la presencia de corrientes excitadoras entrantes de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> de elevada amplitud y desensibilización rápida concordantes con una corriente producida por un canal iónico (Maricq *et al.*, 1991; Puig, Santana, *et al.*, 2004).

Finalmente, tanto por medio de estudios inmunohistoquímicos como electrofisiológicos, se ha demostrado la co-expresión de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A</sub> en las neuronas piramidales de la CPF (Amargós-Bosch *et al.*, 2004; Wedzony *et al.*, 2008), sin embargo, la función de esta co-expresión aún no ha sido dilucidada. Dado que la mayor expresión del receptor 5-HT<sub>2A</sub> reside en la dendrita apical (Cornea-Hébert *et al.*, 1999; Jakab & Goldman-Rakic, 1998) mientras que la expresión del receptor 5-HT<sub>1A</sub> es somato-dendrítica con un marcado énfasis en el cono axonal (Azmitia *et al.*, 1996; DeFelipe *et al.*, 2001; Pompeiano *et al.*, 1992; Riad *et al.*, 2000), se ha sugerido que los axones serotoninérgicos sean capaces de establecer contactos axo-axónicos con las neuronas piramidales, similar a aquellas establecidas por las interneuronas GABAérgicas de candelabro, lo que podría tener un fuerte impacto en la generación de los potenciales de acción. De este modo, los axones serotoninérgicos próximos a las dendritas apicales podrían modular las entradas glutamatérgicas en las neuronas piramidales, mientras aquellos próximos a los conos axonales controlarían la probabilidad de producir un impulso nervioso a través de la activación de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> (Celada *et al.*, 2013). Esta teoría sugiere la existencia de distintas poblaciones de neuronas 5-HT en los NR, cuyos axones pasarían cerca de la dendrita apical o el cono axonal, y generarían respuestas opuestas en la misma neurona. De hecho, se ha descrito la existencia de dos plexos muy densos

de axones serotoninérgicos en las capas I y Va de la corteza somatosensorial, entre ambos, los axones serotoninérgicos se disponen verticalmente, paralelos a las dendritas apicales enriquecidas en receptores 5-HT<sub>2A</sub>. A su vez, se ha descrito la existencia de axones serotoninérgicos que pasan horizontalmente cerca del cono axonal de neuronas piramidales, áreas ricas en receptores 5-HT<sub>1A</sub> y GABA<sub>A</sub> (Puig, Celada, *et al.*, 2004). Otra posibilidad que se sugiere es la de que los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A</sub> regulen de manera cooperativa la manera en que las neuronas piramidales codifiquen las entradas excitatorias en disparos de potenciales de acción, específicamente modulando el receptor 5-HT<sub>2A</sub> la ganancia eléctrica de la neurona por medio del control de la posthiperpolarización, mientras el receptor 5-HT<sub>1A</sub> controla el rango de intensidad de las entradas sobre las cuales la célula codificará las entradas excitatorias en actividad de disparo a través de la regulación del potencial de membrana de la célula (Andrade, 2011).



**Figura 11:** Regulación Serotoninérgica de la CPF. Las neuronas piramidales de la corteza prefrontal proyectan densamente al rafe dorsal y medial, modulando la actividad de las neuronas serotoninérgicas directa e indirectamente. A su vez, la 5-HT endógena modula la actividad de las neuronas piramidales a través de la activación de diferentes receptores, de entre los cuales los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A</sub> juegan el papel principal. (Modificado de Celada *et al.*, 2013).

## 1.5 Serotonina Durante el Neurodesarrollo

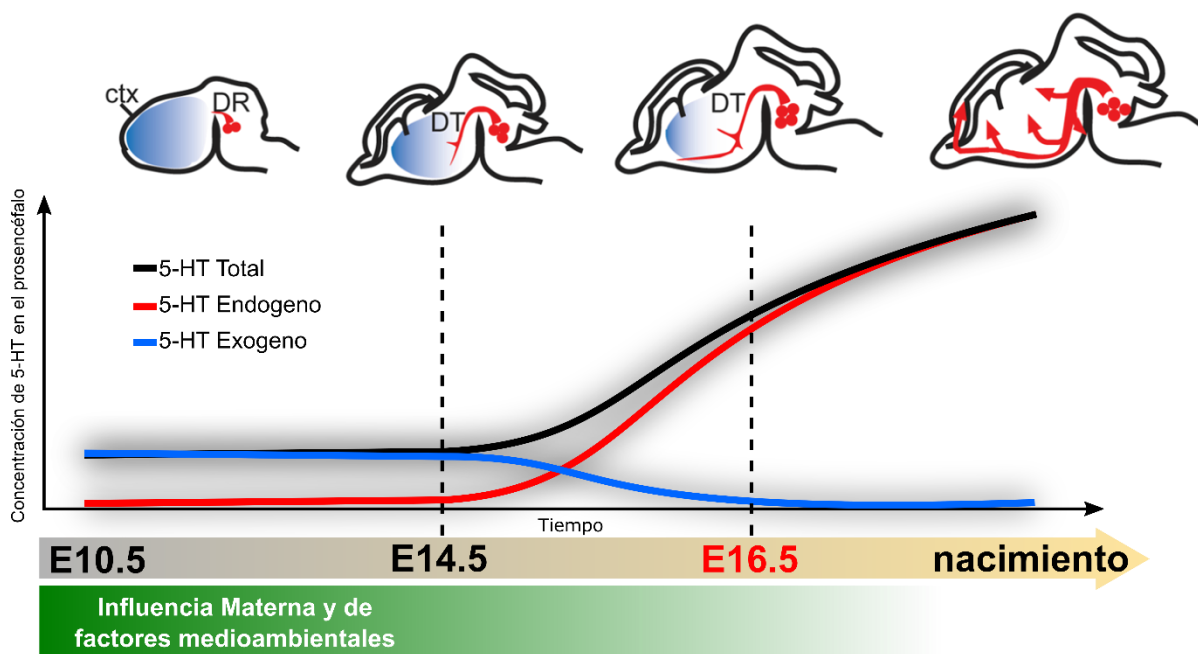
Por otra parte, el sistema serotoninérgico es uno de los primeros en desarrollarse, siendo evidente desde la semana cinco de gestación en humanos (Sundström *et al.*, 1993) y el día de gestación 12 (G12) en roedores (Lauder, 1990; J. L. Rubenstein, 1998), contando con un patrón único de desarrollo y acción espacio-temporal para cada uno de sus componentes (Azmitia, 2001; Nordquist & Oreland, 2010; Vitalis & Parnavelas, 2003). Durante éste periodo, previo a su papel como neurotransmisor, la 5-HT ejerce un importante papel durante el neurodesarrollo, inicialmente actuando de manera autoreguladora, influenciando el desarrollo de las neuronas serotoninérgicas, y conforme el desarrollo continua, la 5-HT actúa en todas las fases subsecuentes: neurogénesis/neuroprotección, gliogénesis, migración celular y finalmente en la diferenciación y maduración (Sodhi & Sanders-Bush, 2004; Whitaker-Azmitia, 2010).

Debido a lo anterior, la alteración de los niveles o la inadecuada activación de receptores específicos de esta monoamina durante una ventana de tiempo particular puede conllevar a alteraciones que van desde la reducción de la organización intercolumnar de las proyecciones axonales (Miceli *et al.*, 2013), hasta anormalidades en la organización laminar y columnar de la corteza cerebral (Daubert & Condrón, 2010; Janušonis *et al.*, 2004; Vitalis *et al.*, 2007), además de múltiples cambios funcionales y conductuales (Gaspar *et al.*, 2003; Insel & Winslow, 1998; Kahne *et al.*, 2002; McNamara *et al.*, 2008; Oberlander, 2012; Whitaker-Azmitia, 2005). Cambios que han sido relacionados con condiciones psiquiátricas como la ansiedad (Lesch *et al.*, 1996), conducta antisocial (Caspi *et al.*, 2002; Nilsson *et al.*, 2006), depresión (Caspi *et al.*, 2003; Sjöberg *et al.*, 2006) y dependencia (Nilsson *et al.*, 2008).

Además, recientemente, usando un modelo de ratón, se demostró que la placenta es capaz de sintetizar su propia 5-HT *de novo* a partir del L-triptófano materno a través de la enzima TPH-1 placentaria (Bonnin *et al.*, 2011) en edades tan tempranas como el G10.5, incluso previo a la aparición de las primeras células serotoninérgicas, lo cual sugiere que ésta es la principal fuente de 5-HT durante las primeras etapas del desarrollo embrionario (Bonnin *et al.*, 2011; Velasquez *et al.*, 2013).

Por otra parte, al parecer, un incremento fuera de lo normal de los niveles de 5-HT durante un período de tiempo crítico del desarrollo tiene mayores efectos perjudiciales sobre el desarrollo del cerebro (por ejemplo, en la organización neuronal de la corteza somatosensorial) que la deficiencia de esta monoamina (Nordquist & Oreland, 2010). Las alteraciones causadas por un exceso de 5-HT durante el desarrollo no sólo se limitan a anormalidades en la organización laminar y columnar de la corteza cerebral (Janušonis

*et al.*, 2004), sino que también se ha encontrado que la modificación de la cantidad de serotonina a la que se encuentran expuestas las crías durante su gestación es capaz de alterar la expresión de los dos principales receptores a serotonina, 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A</sub>, en diversas áreas del cerebro entre las que cabe resaltar la CPF (Blažević & Hranilović, 2013; Lanoir *et al.*, 2006; Lauder *et al.*, 2000).

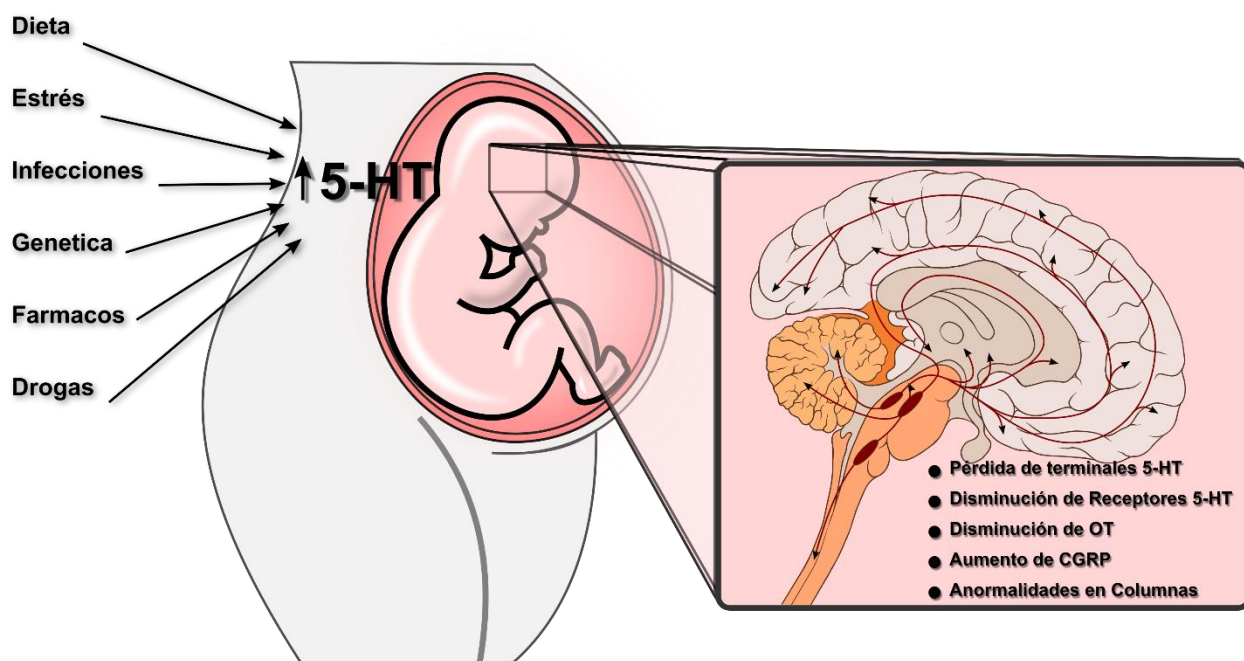


**Figura 12:** Modelo del intercambio progresivo de la fuente de 5-HT en el cerebro fetal, desde una fuente temprana exógena (placenta, línea azul), a una posterior fuente endógena (axones serotonérgicos, línea roja). En verde se muestra la influencia de los factores maternos y medioambientales, la cual sigue una progresión temporal similar a la de la fuente exógena de 5-HT (Modificado de Bonnin *et al.*, 2011)

## 1.6 Modelo de hiperserotoninemia durante el desarrollo (DHS)

La Doctora Patricia M. Whitaker-Azmitia, por medio de su modelo animal de hiperserotoninemia durante el desarrollo (DHS) aborda la teoría de la madre como fuente de la serotonina en etapas tempranas de la gestación, aunando el antecedente de que, en esta misma etapa temprana, no se encuentra completamente formada la barrera hemato-encefálica, lo cual permitiría a la serotonina entrar al cerebro del feto en desarrollo y causar una pérdida de terminales serotonérgicas (Whitaker-Azmitia, 2005). Dicha pérdida siendo postulada a través de una retroalimentación negativa mediada principalmente por el receptor 5-HT<sub>1A</sub> (Oca *et al.*, 2013; Whitaker-Azmitia, 2005, 2010). Para el desarrollo de éste modelo, con base a trabajos previos (Shemer *et al.*, 1988, 1991; Whitaker-Azmitia *et al.*, 1987; Whitaker-Azmitia & Azmitia, 1986), la doctora Whitaker-Azmitia administra a las madres gestantes 1 mg por kilogramo de

peso de 5-Metoxitriptamina (5-MT), un agonista serotoninérgico, desde la fecha en que son identificables las primeras neuronas serotoninérgicas (G12) hasta el nacimiento de las crías y una dosis igual a las crías desde la fecha de su nacimiento hasta el día postnatal 20, un día antes del destete (Kahne *et al.*, 2002).



*Figura 13: Base Teórica del Modelo DHS. Distintos factores como el estrés, la cocaína y algunos fármacos pueden aumentar la concentración de serotonina materna, lo cual, debido a que la barrera hematoencefálica del feto se encuentra inmadura, es capaz de provocar diversas alteraciones en el neurodesarrollo del feto, la concentración de algunos péptidos y posteriormente cambios en su conducta (McNamara *et al.*, 2008; Shemer *et al.*, 1991; Whitaker-Azmitia, 2005).*

De tal modo, bajo el tratamiento anteriormente descrito, las crías desarrollan una serie de anomalías sociales, conductuales y en péptidos, entre las que se puede destacar un incremento a nivel de amígdala del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y una disminución en la oxitocina (OT) en el núcleo paraventricular del hipotálamo (Whitaker-Azmitia, 2005). De igual modo, se ha descrito hipersensibilidad a estímulos auditivos o táctiles, disminución de la alternación en la prueba de alternación espontánea y disminución en las vocalizaciones inducidas por separación de las madres al ser removidas éstas (Kahne *et al.*, 2002). Así como presentar una menor interacción social basada en el olfato, pasar menor tiempo con la madre durante la fase activa y tener un menor apego a la madre en la prueba de regreso a la madre (McNamara *et al.*, 2008).

Cabe resaltar, que dada la similitud entre las alteraciones presentes en el modelo DHS y aquellas presentadas en el autismo, además de la fuerte participación del sistema serotoninérgico en origen de las alteraciones, se ha postulado éste como modelo para dicho trastorno del desarrollo (Kahne *et al.*, 2002). La hipótesis de relacionar un trastorno en los niveles de 5-HT con el autismo surge debido a que la presencia de hiperserotoninemia en los pacientes con dicho trastorno es considerado el dato más ampliamente replicado desde que lo reportaran Schain RJ y Freedman DX (1961), presentándose en aproximadamente una tercera parte de los pacientes (G. M. Anderson *et al.*, 1987). No obstante, aunque importante la teoría serotoninérgica, la genética juega un papel primordial en la etiología del autismo, como demostraron inicialmente Folstein y Rutter (1977) en sus estudios gemelares, el cuál fue seguido por múltiples hallazgos que suman a la fecha más de 100 genes relacionados con dicho trastorno (De Rubeis *et al.*, 2014; Sanders *et al.*, 2012). Además, otras alteraciones, como la disminución de OT, han sido postuladas (J. J. Green & Hollander, 2010; L. Green *et al.*, 2001; LoParo & Waldman, 2015; Modahl *et al.*, 1998), esto debido a la influencia de dicha hormona en la regulación de la conducta social y a que la administración de esta hormona ha demostrado reducir síntomas del autismo como las conductas repetitivas (Hollander *et al.*, 2003) y el bajo aprendizaje social (Gordon *et al.*, 2013).

## 2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

---

Entre los neuromoduladores, la 5-HT ha sido objeto de interés para múltiples investigaciones debido a su amplia distribución en el cerebro, así como su papel en un gran número de conductas las cuales abarcan desde el aprendizaje y memoria hasta la conducta social (Cassel, 2010; Duman & Canli, 2010; Hensler, 2010). Además, cada vez son más los indicios que apuntan a la alteración de la señalización serotoninérgica como un componente crucial del desarrollo de múltiples afecciones psiquiátricas tales como la esquizofrenia, la ansiedad, la depresión y otros trastornos del estado del ánimo (Aghajanian & Marek, 2000; Albert *et al.*, 2014; Eggers, 2013; Lin *et al.*, 2014).

Aunado a lo anterior, los neuromoduladores, participan en la proliferación, migración y diferenciación celular durante el desarrollo gestacional, dando forma así a la comunicación y circuitos neuronales (Ben-Ari, 2013; Frederick & Stanwood, 2009; Herlenius & Lagercrantz, 2004; Ruediger & Bolz, 2007). En éste contexto, el estudio del sistema serotoninérgico ha cobrado interés debido al desarrollo temprano, el cual es evidente desde la quinta semana de gestación en los humanos (Sundström *et al.*, 1993) y el GD 12 en la rata (Lauder, 1990; J. L. R. Rubenstein & Merzenich, 2003). Sin embargo, la expresión de receptores y otras estructuras serotoninérgicas de manera previa al desarrollo de la inervación de éste sistema (Buznikov *et al.*, 2001), sugiere la existencia de una fuente exógena de 5-HT, la cual se ha demostrado que es materno-placentaria (Bonnin *et al.*, 2011).

Múltiples trabajos proponen que la alteración de la homeostasis serotoninérgica durante el desarrollo pre y postnatal de las crías resulta en una predisposición a trastornos psiquiátricos (Booij *et al.*, 2015; Brummelte *et al.*, 2017; Gaspar *et al.*, 2003; Oberlander, 2012; Whitaker-Azmitia, 2001). Modelos animales en los que la concentración de serotonina es alterada en periodos críticos del desarrollo fetal, han mostrado anormalidades conductuales, cognitivas y emocionales (Shah *et al.*, 2018; Suri *et al.*, 2015) así como cambios en la sobrevivencia celular (Dooley *et al.*, 1997), la migración (Riccio *et al.*, 2009, 2011) y la complejidad dendrítica (González-Burgos *et al.*, 1996; Vitalis *et al.*, 2007). En particular, el incremento de la concentración de 5-HT a través del uso de inhibidores de la recaptura de serotonina o de la monoamino oxidasa, así como la emulación de dicho aumento por medio del uso de agonistas serotoninérgicos como la 5-MT, produce múltiples alteraciones neurológicas. Ejemplo de las alteraciones antes citadas son: anormalidades afectivas, cognitivas y deficiencias en la extinción de la respuesta del miedo, así como conductas de tipo ansiedad (Ansorge *et al.*, 2008; Sprowles *et al.*, 2017), además de cambios en la expresión de receptores a 5-HT (Blažević & Hranilović, 2013; Lauder *et al.*, 2000; Madden &

Zup, 2014), anormalidades en la organización laminar y columnar (Cases *et al.*, 1996; Janušonis *et al.*, 2004; Vitalis *et al.*, 1998) y alteraciones de la excitabilidad de áreas como la CPF (Rebello *et al.*, 2014).

De manera particular, la CPF se encuentra densamente inervada por axones de los núcleos monoaminérgicos principales como el área tegmental ventral y los núcleos del Rafé, los cuales a su vez reciben proyecciones de las capas profundas de la CPF del mismo modo que múltiples regiones corticales y subcorticales (Fuster, 2015). Por ésta razón, la alteración o falla de los procesos que regulan el desarrollo del correcto funcionamiento de la CPF dan como resultado una reducción en la intercomunicación entre distintas áreas del cerebro (Catts *et al.*, 2013; Deserno *et al.*, 2012; Ghoshal & Conn, 2015), así como cambios en el balance químico que subyacen a una variedad de déficits cognitivos observados en distintos trastornos psiquiátricos (García *et al.*, 2019).

Por otra parte, a través del uso de inhibición ontogenética de neuronas piramidales de la capa V en el modelo de ácido valproico (Brumback *et al.*, 2018) o la construcción de redes genéticas de co-expresión (Willsey *et al.*, 2013), estudios han mostrado que neuronas en la corteza prefrontal encontradas en las capas V-VI están relacionadas con la etiología del autismo, identificando la etapa fetal como la ventana de tiempo de mayor sensibilidad para las mutaciones responsables de éste trastorno.

**Con base en lo anterior, este trabajo se enfoca en demostrar el efecto de la 5-HT en la I<sub>Glut</sub> de neuronas piramidales agudamente disociadas de la corteza prefrontal de las ratas cuyas madres fueron tratadas con un agonista serotoninérgico durante la gestación.**

Nosotros consideramos que éste trabajo puede contribuir al entendimiento e interpretación del efecto del estrés materno y los procesos inflamatorios durante el embarazo, ya que ambos incrementan la liberación de 5-HT placentaria al medio ambiente fetal (Goeden *et al.*, 2016; Oberlander, 2012; Peters, 1986, 1990; St-Pierre *et al.*, 2016). Aunado a lo anterior, una creciente cantidad de evidencia asocia el uso de inhibidores selectivos de la recaptura de 5-HT durante el embarazo con cambios en la morfología cerebral y trastornos del neurodesarrollo (Lattimore *et al.*, 2005; Olivier *et al.*, 2013; Velasquez *et al.*, 2013). Por tanto, en el presente estudio, se aplicó 5-MT, un agonista selectivo serotoninérgico no selectivo, con el fin de examinar si éste tratamiento podía o no alterar la modulación serotoninérgica de la I<sub>Glut</sub>.

Nuestro trabajo es relevante ya que denota que los mecanismos de modulación de las corrientes iónicas del cerebro de las crías pueden ser afectados de manera permanente a través del medio ambiente materno. Además, estudios de esta índole son necesarios ya que ofrecen evidencia de que la alteración

de las concentraciones de 5-HT durante la gestación pueden conllevar a severas patologías en los circuitos neurales de las crías. Siendo lo anterior una de las hipótesis de la génesis del Autismo (Whitaker-Azmitia, 2005), no obstante, hipótesis como la mencionada solo han sido analizadas desde un enfoque conductual y morfológico sin abordar los cambios subyacentes a nivel de los mecanismos electrofisiológicos.

### 3 HIPÓTESIS

---

Si la serotonina inhibe las corrientes NMDA y la administración materna del agonista serotoninérgico 5-Metoxitriptamina (5-MT) durante el desarrollo de las crías produce un incremento del efecto inhibitor de la serotonina, entonces esto puede ser debido a un aumento en la expresión y/o sensibilidad del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en neuronas piramidales de la capa V-VI de la corteza prefrontal de rata.

## 4 OBJETIVOS

---

### 4.1 General

Estudiar los cambios en la respuesta moduladora de la serotonina sobre las corrientes activadas por glutamato de tipo NMDA y AMPA en neuronas piramidales de la capa V-VI de la corteza prefrontal de rata (entre los días postnatales 40 y 60) subsecuentes a la administración materna del agonista serotoninérgico 5-Metoxitriptamina (5-MT) durante el desarrollo de las crías (días gestacionales 11 a 21).

### 4.2 Particulares

1. Identificar en neuronas piramidales agudamente disociadas de las capas V-VI de corteza prefrontal de rata el subgrupo de receptores a glutamato afectado por el tratamiento con 5-MT durante la gestación.
2. Caracterizar las diferencias entre los grupos experimentales en las corrientes iónicas activadas por glutamato de tipo NMDA (en presencia de glicina) y/o AMPA en neuronas piramidales agudamente disociadas de la capa V - VI de corteza prefrontal de rata.
  - 2.1. Caracterización del pico, estado estacionario, relación EE/P y constante de tiempo de desensibilización ( $\tau$ ).
3. Analizar los cambios provocados por el tratamiento con 5-MT durante la gestación en la respuesta moduladora de la serotonina sobre las corrientes activadas por glutamato de tipo NMDA (en presencia de glicina) y/o AMPA en neuronas piramidales agudamente disociadas de la capa V - VI de corteza prefrontal de rata.
  - 3.1. Caracterización del pico, estado estacionario, relación EE/P y constante de tiempo de desensibilización ( $\tau$ ) en presencia de múltiples concentraciones de serotonina (1, 3, 10, 30 y 100  $\mu$ M).
4. Determinar la participación de los receptores a serotonina más abundantes en las neuronas piramidales de la capa V-VI de la corteza prefrontal en la respuesta moduladora de las corrientes activadas por glutamato de tipo NMDA (en presencia de glicina) y/o AMPA.
  - 4.1. Caracterización del pico, estado estacionario, relación EE/P y constante de tiempo de desensibilización ( $\tau$ ) en presencia de múltiples concentraciones de los agonistas selectivos de cada receptor a serotonina.

## 5 METODOLOGÍA

---

Todos los procedimientos fueron llevados a cabo de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). La creación del modelo se realizó en ratas hembra de la cepa Sprague-Dawley con diagnóstico de segundo parto, procedentes del Bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Posteriormente, los experimentos se realizaron en las crías macho resultantes entre las edades P40 y P60. Se eligió como fecha de inicio para los experimentos la edad de P40, ya que en ésta fecha los receptores serotoninérgicos han alcanzado el nivel que mantendrán durante la edad adulta en la CPF (García-Alcocer *et al.*, 2006; Morilak & Ciaranello, 1993; Murrin *et al.*, 2007; Zilles *et al.*, 1985).

### 5.1 Tratamiento Farmacológico

Para el tratamiento con 5-MT durante el desarrollo, se utilizó una variación del protocolo para obtención del modelo DHS del desarrollo descrito inicialmente por Patricia M Whitaker-Azmitia (Shemer *et al.*, 1991; Whitaker-Azmitia, 2005; McNamara *et al.*, 2008) el cual se describe a continuación con algunas modificaciones.

#### 5.1.1 Elección de la droga

Se eligió la 5-MT por su relativamente alta potencia en todos los receptores a serotonina probados (McNamara *et al.*, 2008), aproximadamente 1/10 la potencia de la serotonina. La adición de un grupo metoxi, en lugar del hidroxilo de la 5-HT, hace que la molécula sea más estable en solución a pH neutro y reduce la sensibilidad a la luz. A pesar de que es metabolizada por tanto por la monoaminooxidasas A como la B, es un sustrato relativamente más pobre que la serotonina, por lo cual se puede esperar que la vida media de la inyección sea un poco más larga.

#### 5.1.2 Dosis

Se utilizó una dosis de 1.0 mg/Kg disueltos en solución salina con 0.4% de DMSO, dosis la cual, según la bibliografía consultada, presenta efectos significativos en el desarrollo de las terminales serotoninérgicas inhibiendo su crecimiento (Lauder *et al.*, 2000; Shemer *et al.*, 1991; Whitaker-Azmitia *et al.*, 1987). Asumiendo una distribución en el agua total del cuerpo, y su relativamente baja potencia comparada con la 5-HT, los niveles de 5-MT de la rata aproximan un 50% de incremento en los niveles de 5-HT en suero, o alrededor de 100 ng/ml de suero (Shemer *et al.*, 1991). La dosis usada en este modelo no causa ningún

signo del síndrome serotoninérgico clásico en los animales, pero al final del tratamiento se puede encontrar un poco de edema en las patas de las madres.

### 5.1.3 Inyección

Para la creación del modelo se utilizaron ratas hembra preñadas de la cepa Sprague-Dawley, las cuales fueron separadas en dos grupos. El primer grupo, fue inyectado de manera subcutánea con el agonista no específico de la serotonina 5-MT (SIGMA-Aldrich Company) desde un día antes del momento en que las neuronas serotoninérgicas son identificables en el G11, (Whitaker-Azmitia, 2010), hasta el día del parto (PNO). De manera similar, el segundo grupo de hembras fue inyectado durante el mismo período de tiempo con un volumen equivalente de solución salina con 0.4% de DMSO a modo de descartar la influencia de la solución vehículo en los subsecuentes análisis. Todas las inyecciones se realizaron a una misma hora y siguiendo una metodología de doble ciego.

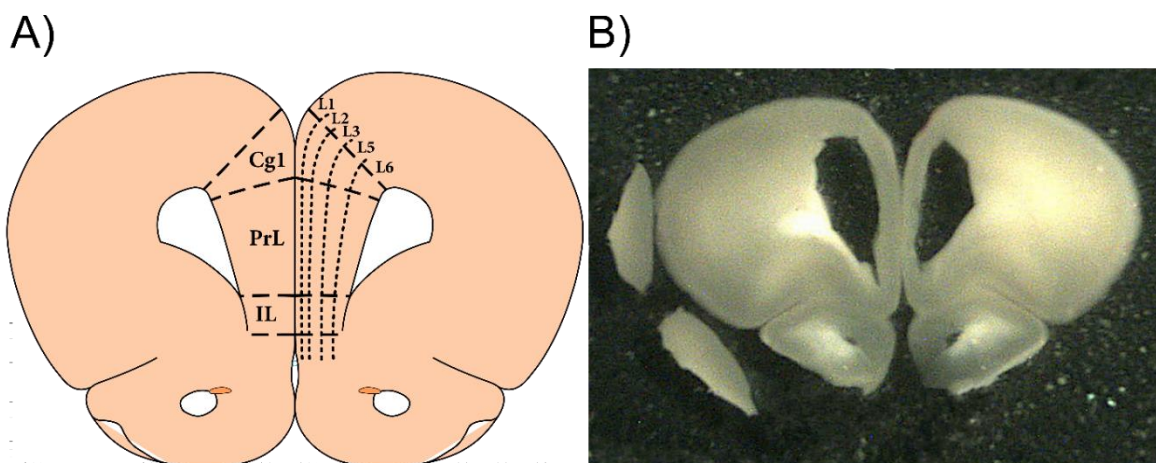
Las modificaciones realizadas al protocolo de Whitaker-Azmitia fueron: la administración se comenzó un día antes del momento en que las neuronas serotoninérgicas son identificables (G11), en vez del día G12; y se eliminó la serie de inyecciones realizadas a la cría a partir el día post-natal 0 (PND 0), el día de nacimiento; hasta el día antes del destete (PND 21) debido a que éste estudio se enfoca específicamente en los cambios en el sistema serotoninérgico que puedan ser producidos por influencia materna.

## 5.2 Registro Electrofisiológico

### 5.2.1 Disociación Aguda

El protocolo de disociación que se empleó ha sido previamente descrito (Bargas *et al.*, 1994; Surmeier *et al.*, 1996; Flores-Hernández *et al.*, 2000, 2002) y se explica a continuación con algunas modificaciones:

Las ratas se anestesian con pentobarbital sódico a una dosis de 40 mg/kg y posteriormente se decapitan. Los cerebros son disecados rápidamente y se colocan en solución fría de isetionato con bajo calcio (en mM): 140 isetionato de sodio, 2 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 0.1 CaCl<sub>2</sub>, 23 glucosa, 15 HEPES, pH = 7.4, 300-310 mOsm/L y suplementados con (en mM): 1 ácido pirúvico, 0.005 glutatión, 0.1 NG-nitro-L-arginina, 1 ácido kinurénico, y gaseada con O<sub>2</sub>. Posteriormente se obtienen rebanadas coronales de 350 µm con ayuda de un vibrátomo (Campden) mientras están sumergidas en la misma solución. De las rebanadas obtenidas, se diseccionan las capas V – VI de la corteza prefrontal tal como se muestra en la **Figura 14**.



**Figura 14:** Corte coronal de cerebro de rata. A) Representación esquemática en la que se muestran la localización aproximada de las áreas y capas que componen la CPF de la rata (Gabbott et al., 1997, 2005; Paxinos & Watson, 2004). B) Micrografía de la disección de las capas V-VI de la CPF de rata utilizadas durante uno de los experimentos descritos en éste trabajo.

Posteriormente las rebanadas disecadas se mantienen entre 45 a 90 minutos a temperatura de 30°C en solución salina balanceada de Earle (EBSS, SIGMA) amortiguada con bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) y suplementada con (en mM): 1 ácido pirúvico, 0.005 glutation, 0.1 NG -nitro-L-arginina, 1 ácido kinurénico; burbujeada con 95% O<sub>2</sub>/ 5% CO<sub>2</sub>, pH = 7.4 ajustado con NaOH, 300-310 mOsm/L.

Después de 45 minutos de incubación se toma una rebanada de CPF para su tratamiento enzimático, el cual se realiza en una cámara de cultivo de 40 ml con solución salina balanceada de Hanks (HBSS, SIGMA) amortiguada con HEPES burbujeada con O<sub>2</sub>, conteniendo 0.75 mg/ml de papaína (Calbiochem) a 33°C ± 1, durante 10 minutos y suplementada con (en mM): 1 ácido pirúvico, 0.005 glutation, 0.1 NG -nitro-L-arginina, 1 ácido kinurénico.

Transcurrido el tiempo de la digestión enzimática, el tejido es lavado con la solución de isetionato y posteriormente dissociado mecánicamente con pipetas Pasteur de diferentes calibres (pulidas al fuego). La suspensión de células es sembrada en cajas Petri de 35 mm (Nunclon Surface, NUNC) montadas en el microscopio de registro. Después de 10 minutos de incubación la suspensión es lavada con una solución de fondo (en mM): 140 NaCl, 23 Glucosa, 15 HEPES, 2 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub> y 1% rojo fenol, burbujeada con O<sub>2</sub>, pH = 7.4 ajustado con NaOH, 300-310 mOsm/L; para su posterior registro por medio de la técnica de fijación de voltaje en configuración de célula completa.

Las modificaciones realizadas al protocolo de disociación fueron: cambios en el tratamiento enzimático, se realizaron pruebas en cuanto al tiempo, cantidad y tipo de enzima, obteniendo que la papaína a una concentración de 0.75 mg/ml durante 10 min., a  $33^{\circ}\text{C} \pm 1$ , presenta menor daño en la estructura celular. Estas pruebas se realizaron de forma cualitativa y permitieron la obtención de células disociadas de mejor viabilidad.

### 5.2.2 Técnica de célula completa en protocolos de fijación de voltaje (*Whole-cell*).

Se empleó la técnica de célula completa con fijación de voltaje (Bargas *et al.*, 1994). Los electrodos de registro fueron estirados de tubos capilares de borosilicato tipo Corning 8250 (WPI 1B120F4, Sarasota FL) utilizando un Micropipette Puller Modelo p-97, (Sutter Instrument Co).

La solución interna para los registros de corriente se encuentra compuesta de (en mM): 175 N-metil-D-glutamina (NMDG), 40 HEPES, 2  $\text{MgCl}_2$ , 10 ácido etilen glicol-bis ( $\beta$ -aminoetil éter) -N, N, N', N'-tetraacético (EGTA), 12 fosfocreatina, 3  $\text{Na}_2\text{ATP}$ , 0.35  $\text{Na}_3\text{GTP}$ , 0.1 leupeptina, pH = 7.3 con  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 265 – 270 mOsm/L.

La solución externa se compone de (en mM): 127 NaCl, 20 CsCl, 5  $\text{BaCl}_2$ , 2  $\text{CaCl}_2$ , 12 glucosa, 10 HEPES, pH = 7.3 con NaOH, 300-305 mOsm/L.

Los registros se obtuvieron con un amplificador para fijación de voltaje “voltage clamp” Axopatch 1-D (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) y un digitalizador Digidata 1322A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), controlados con el programa pClamp Versión 9 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) ejecutándose en una computadora con procesador tipo Pentium IV (1.5GHz), 1 GB de memoria RAM y sistema operativo Windows XP SP3.

La resistencia de los electrodos es típicamente de 6-10  $\text{M}\Omega$  en el baño. Después de la ruptura del sello, la resistencia serial es menor a 25  $\text{M}\Omega$ . Cuando el cambio de la resistencia serial es mayor al 50% el experimento es suspendido. El potencial de membrana se mantiene en -80mV mientras no hay protocolo activo.

Para su registro, se disecó la capa V – VI, como anteriormente se mencionó, eligiéndose para su registro las neuronas piramidales de mayor capacitancia, la menor longitud y número de dendritas, y que mantengan sus características morfológicas (forma de pirámide o pera y dendrita apical visible).

### 5.2.3 Aplicación de fármacos

Para inducir la corriente activada por ligando, este fue aplicado a través de un sistema de dos capilares con un ángulo de 45° entre ellos y una distancia de  $300 \pm 100 \mu\text{m}$  de la célula a registrar. Un capilar lleva la solución externa (con/sin el neuromodulador) y el otro lleva esta misma solución además del ligando a utilizar. El intercambio de soluciones se realizó por la apertura de válvulas solenoides 98302-00 (Cole-Parmer) comandadas por la salida digital del sistema Digidata 1322A, y un aparato de control fabricado en el laboratorio.

La célula fue bañada inicialmente con la solución externa y posteriormente se bañó la célula con la solución que contiene el ligando a probar durante 3s, regresando tras este tiempo a la solución externa. El tiempo de intercambio medio (20-50) en que el electrodo detecta el cambio de las condiciones iónicas entre una solución y otra es de 7.55 ms.

Los ligandos y neuromoduladores utilizados (**Tabla 1**) se obtuvieron de SIGMA-Aldrich Company y fueron preparados como soluciones concentradas en agua desionizada.

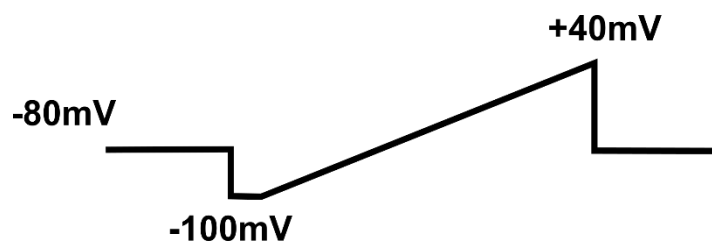
*Tabla 1: Ligandos y neuromoduladores utilizados durante el registro electrofisiológico de célula única para analizar los cambios en la respuesta moduladora de la serotonina sobre las corrientes activadas por Glutamato*

Ligandos y Neuromoduladores	Concentración	PM (g/mol)	Solubilidad	Stock Concentración
Glutamato	100 $\mu\text{M}$	187.13	H <sub>2</sub> O	100 mM
NMDA	100 $\mu\text{M}$	147.13	H <sub>2</sub> O	100 mM
5-HT	1, 3, 10, 30 y 100 $\mu\text{M}$	212.68	H <sub>2</sub> O: 17 mg/ml	1 mM y 100 mM
(±)-08-OH-DPAT	0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 y 100 $\mu\text{M}$	328.29	H <sub>2</sub> O:3.28	1 mM y 10 mM
(±)-DOI	0.1, 0.3, 1, 3, 10 y 30 $\mu\text{M}$	357.62	H <sub>2</sub> O: 10 mg/ml	1 mM y 30 mM

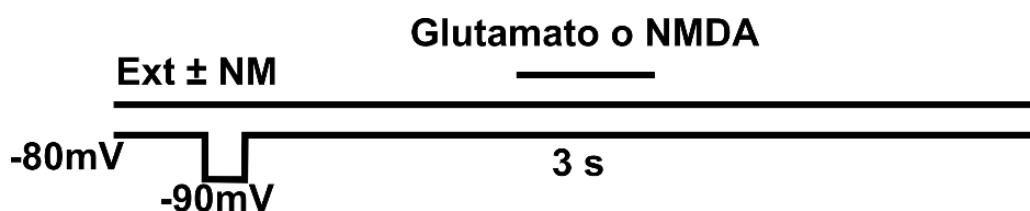
### 5.2.4 Protocolos electrofisiológicos.

Los protocolos empleados para el registro electrofisiológico fueron:

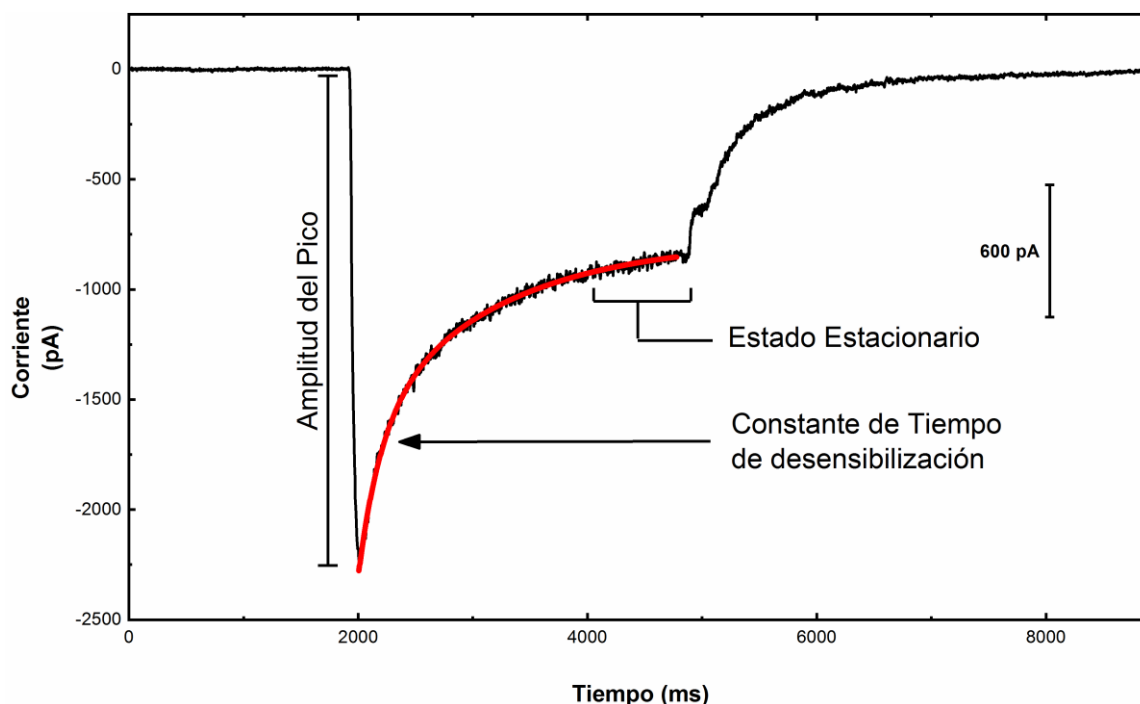
*Rampa* (-100 mV a +40 mV) con una duración de 100 ms para generar las corrientes de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>++</sup>.



*Aplicación de Glutamato o NMDA.* Se ocupó un potencial de mantenimiento de -80mV durante seis segundos; de los cuáles tres segundos son para la aplicación del neurotransmisor (Glutamato 100  $\mu$ M o NMDA 100  $\mu$ M) registrándose la actividad a una frecuencia de muestreo de 403.23 Hz (cada 2.48 ms). Durante este protocolo se aplicó un pulso de -90 mV durante 200 ms para seguir los cambios en la resistencia de membrana, cuando se observó un cambio de más del 10 % en este parámetro la célula fue excluida. Esta condición experimental se dejó correr hasta obtener tres o cuatro trazos de corriente estable, tomándose como referencia y lavado del efecto del neuromodulador sobre la corriente activada por Glutamato o NMDA.



Con este protocolo se llevaron a cabo las fases experimentales que se describen a continuación para la aplicación del neurotransmisor en conjunto con 5-HT y los agonistas de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A</sub>. En cada una de las condiciones se midió la amplitud del Pico de la corriente (Pico), su estado estacionario (EE) y la constante de tiempo de desensibilización (**Figura 15**), así como la relación entre el estado estacionario y la amplitud del pico (EE/P). Siendo la amplitud del pico la medida desde el potencial de membrana en reposo hasta el valor máximo (en números absolutos) de la corriente. Por otra parte, el estado estacionario fue calculado como el promedio de los valores encontrados en 250 ms de la corriente posteriores a la desensibilización de la corriente. Por último, la constante de tiempo de desensibilización se calculó a partir de un ajuste de la fase de desensibilización de la corriente a una función exponencial de decaimiento.



**Figura 15:** Gráfico representativo de una corriente activada por Glutamato en la cual se señalan las características que se analizaron en cada una de las fases experimentales expuestas. La amplitud del pico, medido desde el potencial de membrana en reposo hasta el valor máximo (en números absolutos) de la corriente. El estado estacionario, calculado como el promedio de los valores encontrados en 250 ms de la corriente posterior a la desensibilización o los últimos 250 ms de aplicación en caso de no alcanzarse el final de la desensibilización. Y la constante de tiempo de desensibilización, calculada a partir del ajuste de la fase de desensibilización de la corriente a una función exponencial de decaimiento (línea roja).

**Glutamato (100  $\mu$ M) +  $Mg^{++}$ :** La célula fue perfundida con solución externa +  $Mg^{++}$ , con una interrupción de 3 segundos durante los cuales se bañó la célula con Glutamato +  $Mg^{++}$  disueltos en solución externa. La concentración de Glutamato fue 100  $\mu$ M. El  $Mg^{++}$  se aplicó en una concentración de 1 mM, ya que a ésta concentración el bloqueo de los receptores tipo NMDA es casi completo (R. J. Clarke & Johnson, 2006; Kuner & Schoepfer, 1996). Esta condición experimental se dejó correr hasta obtener tres o cuatro trazos de corriente estable en cada caso, tomándose como referencia y lavado del efecto de la 5-HT sobre la corriente activada por Glutamato en co-aplicación con  $Mg^{++}$ .

**Glutamato (100  $\mu$ M) +  $Mg^{++}$  + 5-HT:** La célula se perfundió con solución externa +  $Mg^{++}$  + 5-HT, con una interrupción de 3 segundos durante los cuales se bañó la célula con Glutamato +  $Mg^{++}$  + 5-HT disueltos en solución externa. La concentración de Glutamato fue 100  $\mu$ M, el  $Mg^{++}$  se aplicó a una concentración de 1mM y la 5-HT a 30 $\mu$ M. Esta condición experimental se dejará correr hasta obtener tres o cuatro trazos de corriente estable.

*NMDA (100  $\mu$ M) + 5-HT:* La célula fue perfundida con solución externa + 5-HT, con una interrupción de 3 segundos durante los cuales se bañó la célula con NMDA externa + 5-HT disueltos en solución. La concentración de NMDA fue 100  $\mu$ M. La 5-HT se aplicó en diferentes concentraciones desde 1  $\mu$ M hasta 100  $\mu$ M (1, 3, 10, 30 y 100  $\mu$ M) para la posterior realización de la curva Dosis-Respuesta. Esta condición experimental se dejó correr hasta obtener tres o cuatro trazos de corriente estable en cada caso. Las diferentes concentraciones fueron administradas en orden aleatorio y en un máximo de 3 concentraciones por célula a modo de compensar los cambios causados por la influencia del factor temporal y la viabilidad de la célula.

*NMDA (100  $\mu$ M) + Agonista HTR1A (8-OH-DPAT):* La célula se perfundió con solución externa + el agonista del receptor 5-HT<sub>1A</sub>, 8-OH-DPAT, con una interrupción de 3 segundos durante los cuales se bañó la célula con NMDA + 8-OH-DPAT disueltos en solución externa. La concentración de NMDA fue 100  $\mu$ M. El 8-OH-DPAT se aplicó en diferentes concentraciones desde 0.1  $\mu$ M hasta 100  $\mu$ M (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 y 100  $\mu$ M) para la posterior realización de la curva Dosis-Respuesta. Esta condición experimental se dejó correr hasta obtener tres o cuatro trazos de corriente estable. Las diferentes concentraciones fueron administradas en orden aleatorio y en un máximo de 3 concentraciones por célula a modo de compensar los cambios causados por la influencia del factor temporal y la viabilidad de la célula.

*NMDA (100  $\mu$ M) + Agonista HTR2A (DOI):* La célula fue perfundida con solución externa + el agonista del receptor 5-HT<sub>2A</sub>, DOI, con una interrupción de 3 segundos durante los cuales se bañó la célula con NMDA + DOI disueltos en solución externa. La concentración de NMDA fue 100  $\mu$ M. El DOI se aplicó en diferentes concentraciones desde 0.1  $\mu$ M hasta 30  $\mu$ M (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 y 100  $\mu$ M) para la posterior realización de la curva Dosis-Respuesta. Esta condición experimental se dejó correr hasta obtener tres o cuatro trazos de corriente estable. Las diferentes concentraciones fueron administradas en orden aleatorio y en un máximo de 3 concentraciones por célula a modo de compensar los cambios causados por la influencia del factor temporal y la viabilidad de la célula.

*NMDA (100  $\mu$ M) + 8-OH-DPAT + DOI:* La célula se perfundió con solución externa + 8-OH-DPAT + DOI, con una interrupción de 3 segundos durante los cuales se bañó la célula con NMDA + 8-OH-DPAT + DOI disueltos en solución externa. La concentración de NMDA fue 100  $\mu$ M. La concentración del agonista del receptor 5-HT<sub>1A</sub>, 8-OH-DPAT, fue 30  $\mu$ M, mientras que el agonista del receptor 5-HT<sub>2A</sub>, DOI, se aplicó a 0.1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M administradas en orden aleatorio. Esta condición experimental se dejó correr hasta obtener tres o cuatro trazos de corriente estable.

### 5.3 Análisis estadístico.

Los valores en tablas, gráficas y texto, representan el valor de la media de los resultados obtenidos  $\pm$  su error estándar de la media (ESM). Los ajustes y gráficas fueron realizados en el programa Origin 9.1 (Microcal Software Inc., Northampton, MA). En el análisis estadístico, los datos fueron analizados primero con una prueba Shapiro ( $p < 0.05$ ) para determinar el comportamiento de una distribución normal. Las diferencias entre las medias de grupos experimentales serán analizadas mediante la prueba "t" apropiada o un análisis de varianza correspondiente.

El efecto de los neuromoduladores sobre las distintas características de la corriente (Pico, EE, Tau, EE/P) se calculó como la reducción porcentual de estas características en presencia del neuromodulador con respecto al promedio de su valor en las condiciones de referencia (sin el modulador) y lavado. Dicho porcentaje de reducción se calculó con la formula descrita a continuación:

$$\% \text{ Reduccion} = \left( 1 - \frac{\delta IN}{(\delta IR + \delta IL)/2} \right) * 100 \quad (1)$$

Donde  $\delta IR$  es el valor de la característica a medir durante las condiciones de referencia,  $\delta IL$  el valor de ésta misma posterior al lávalo y  $\delta IN$  su valor en presencia del neuromodulador que se está probando.

Para el análisis de la curva dosis-efecto, primero se eligió la función matemática que mejor describiera los datos, para lo cual se ocuparon una función sigmoidea simétrica (Ecuación 2), una función sigmoidea asimétrica (Ecuación 3), un modelo de crecimiento exponencial (Ecuación 4) y una función lineal, eligiéndose como mejor ajuste aquella en que el criterio de información de Akaike (AIC) fuera menor (Burnham & Anderson, 2002).

$$y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + e^{-K(\log(x) - \log(x_c))}} \quad (2)$$

$$y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + e^{-K(x - x_c)}} \quad (3)$$

$$y = A_1 + (A_2 - A_1) \left( 1 - e^{-\frac{x}{t}} \right) \quad (4)$$

Donde  $A_1$  representa el límite menor de la curva (Min),  $A_2$  el limite mayor (Max),  $K$  el valor de la pendiente (Pndte.),  $x_c$  el valor de la dosis efectiva 50 ( $EC_{50}$ ) y  $t$  el valor de la constante de crecimiento de la curva (Cnte.)

El cálculo de la AIC se realizó de acuerdo con la formula

$$AIC = -2 \log(\mathcal{L}(\hat{\theta})) + 2K \quad (5)$$

Donde  $n$  representa el número de datos utilizados para el ajuste,  $K$  es igual a el número de parámetros estimados y  $\log(\mathcal{L}(\hat{\theta}))$  es calculado a partir de las siguientes ecuaciones:

$$\log(\mathcal{L}(\hat{\theta})) = -\frac{1}{2}n \log(\hat{\sigma}^2) - \frac{n}{2} \log(2\pi) - \frac{n}{2} \quad (6)$$

$$\hat{\sigma}^2 = \frac{RSS}{n} \quad (7)$$

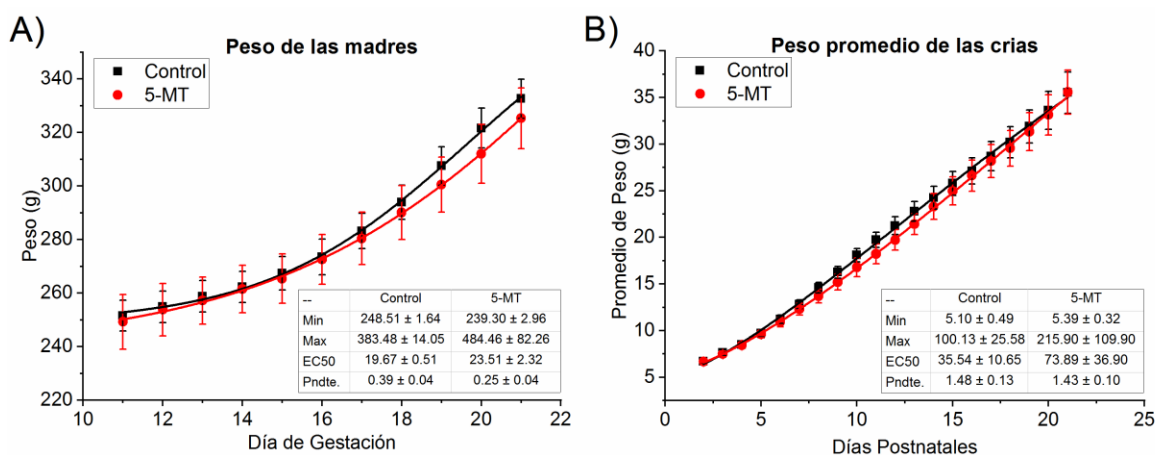
Por último, una vez elegido el modelo que mejor describe los datos, se realizó el ajuste a la misma función tanto de los datos del grupo control como del grupo tratado, y se realizó una comparación estadística de las curvas a través de la siguiente formula:

$$F = \frac{((S_M - (S_C + S_T))/k)}{((S_C + S_T)/(N_C + N_T - 2k))} \quad (8)$$

Donde  $S_M$  es la suma de residuos al cuadrado (RSS) del ajuste de los datos combinados de ambos grupos,  $S_C$  es la RSS del ajuste de los datos del grupo control,  $S_T$  es la RSS del ajuste de los datos del grupo tratado,  $N_C$  y  $N_T$  son el número de observaciones para el grupo control y tratados, respectivamente, y  $k$  es el número de parámetros utilizados para el ajuste. Esta prueba estadística sigue una distribución F con  $k$  y  $N_C + N_T - 2k$  grados de libertad. Tanto la elección de la función de ajuste, como la comparación estadística entre grupos, fue realizada con ayuda del paquete *drc* (Ritz *et al.*, 2015) para el entorno de programación R (R Core Team, 2019).

## 6 RESULTADOS

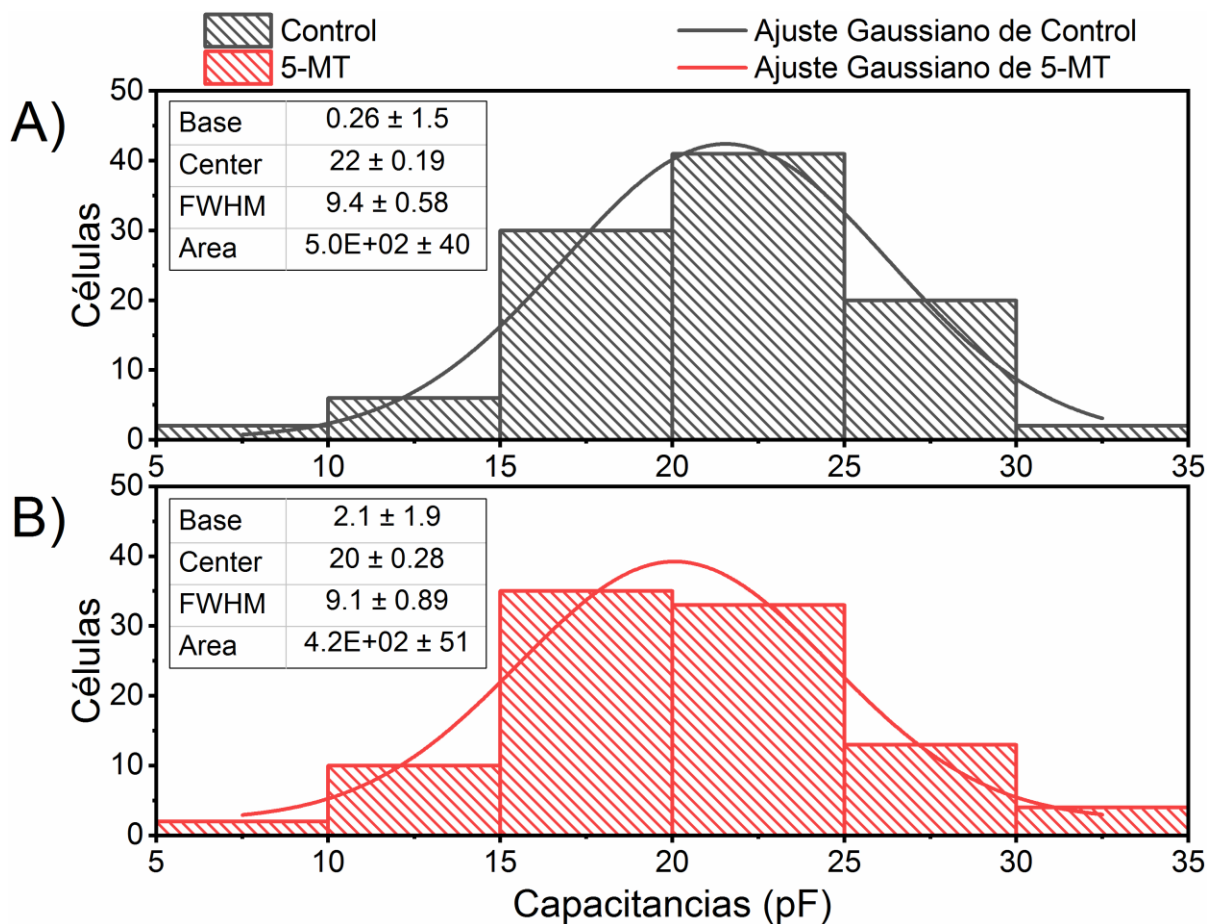
Para la realización de los experimentos se trató un total de 43 ratas preñadas, de las cuales 21 fueron administradas con 5-MT (Grupo 5-MT) y 22 administradas solamente con el vehículo (Grupo Control). Una vez separadas por grupo, con el fin de asegurarnos que los cambios observados no fueran a causa de desnutrición, se eligieron diez de estas ratas de manera aleatoria para realizar un seguimiento de su peso durante el tiempo del tratamiento (desde G11 hasta G21), así como del peso promedio de sus crías desde el segundo día después del nacimiento (PND2) hasta el destete (PND21). El seguimiento de estos pesos se graficó y ajustó a una función sigmoidea, no encontrándose diferencia significativa entre los grupos en ninguno de los dos casos (Peso de madres:  $F_{4,220}=0.48$ ,  $p=0.75$ ; Peso promedio de las crías:  $F_{4,400}=1.19$ ,  $p=0.31$ ; **Figura 16**).



**Figura 16:** Graficas del seguimiento del peso de las madres durante el tratamiento (A) y el peso promedio de las crías desde el PND2 hasta el PND21 (B). En ambos casos la progresión de los pesos se ajustó a una función sigmoidea, no encontrándose diferencia significativa entre los grupos (Peso de madres:  $F_{4,220}=0.48$ ,  $p=0.75$ ; Peso promedio de las crías:  $F_{4,400}=1.19$ ,  $p=0.31$ )

De las camadas gestadas por las ratas administradas se utilizaron un total de 67 crías para la obtención de 198 células, 101 pertenecientes a las 34 crías del grupo control y 97 células más provenientes de las 33 crías del grupo tratado con 5-MT durante la gestación. En la muestra solo se incluyeron las neuronas que contaran con una resistencia de membrana superior a  $1G\Omega$  y una resistencia de entrada de menor a  $25 M\Omega$ . El promedio de las resistencias de entrada de las 198 células fue de  $17.53 M\Omega$  con una desviación estándar (SD) de  $6.07 M\Omega$ . Siendo el promedio para el grupo control  $18.28 M\Omega$  con SD de  $5.99 M\Omega$  y  $16.72 M\Omega$  con SD de  $6.11 M\Omega$  para el grupo 5-MT, sin diferencia significativa entre ambos grupos ( $T_{188.5} = 1.79$ ;  $p=0.07$ ).

El tamaño aproximado de las células se determinó a través del valor de su capacitancia, asumiendo para su cálculo una capacitancia específica de  $0.9 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  y una forma esférica de la célula (Gentet *et al.*, 2000). La capacitancia celular promedio para el grupo control fue de  $21.03 \text{ pF}$  y de  $20.46 \text{ pF}$  para el grupo tratado, con una SD de  $4.46$  y  $4.82$  respectivamente, sin diferencia significativa entre los grupos ( $T_{193.3} = 0.86$ ,  $p=0.39$ ; **Figura 17**)

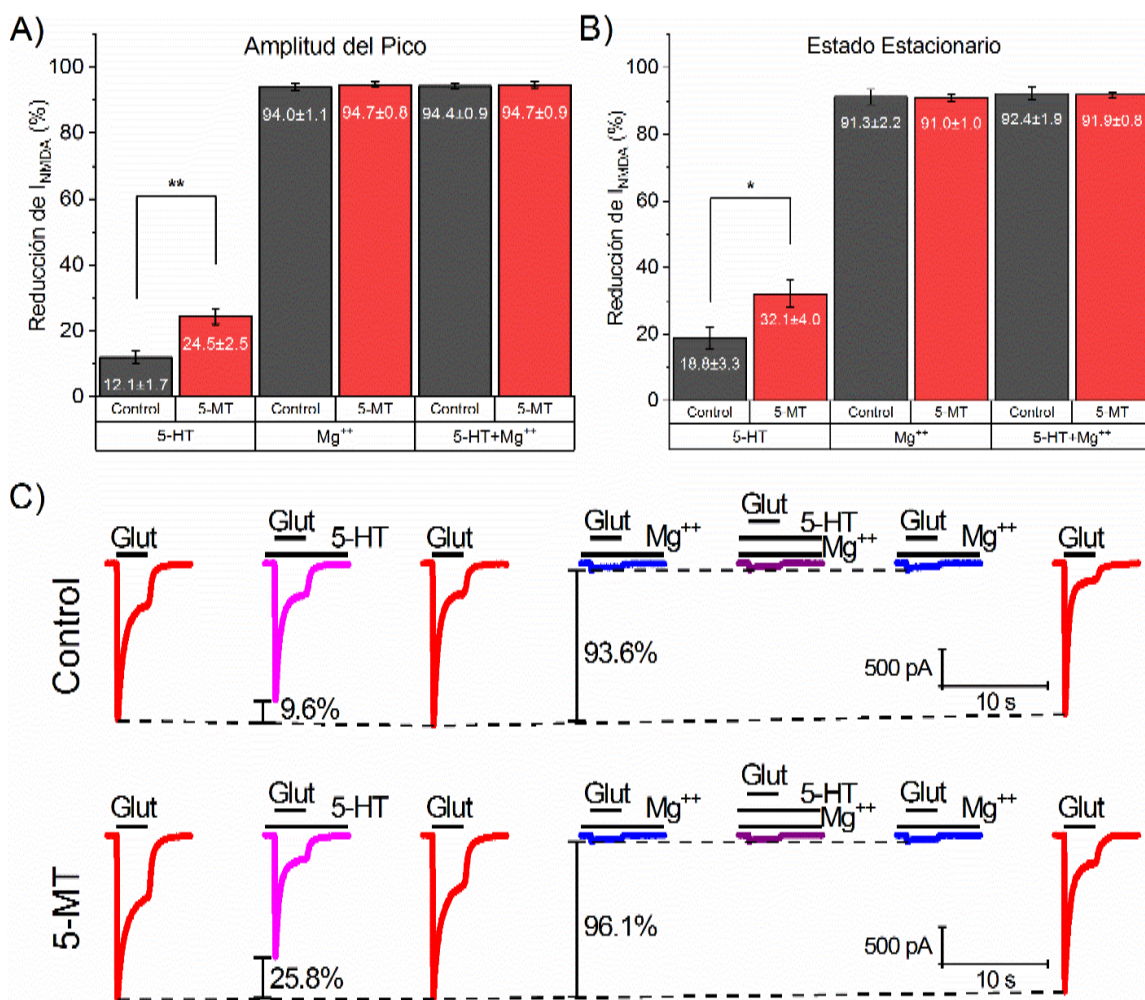


**Figura 17:** Histograma de frecuencia de la capacitancia de las neuronas del grupo control (A) y aquellas tratadas con 5-MT (B). El grupo control presento un valor promedio de capacitancia de  $21.03 \text{ pF}$  con una SD de  $4.46 \text{ pF}$  ( $n= 101$ ). Por otra parte, el grupo 5-MT tuvo un valor promedio de  $20.46 \text{ pF}$  con una SD de  $4.82 \text{ pF}$  ( $n= 97$ ). No se encontró diferencia significativa entre los grupos ( $T_{193.3} = 0.86$ ,  $p=0.39$ ).

En cada experimento, antes de comenzar el registro de las corrientes de glutamato o NMDA, se evaluó la viabilidad de las células con una rampa de voltaje (de  $-100\text{mV}$  a  $+40\text{mV}$ ) con duración de  $300 \text{ ms}$  para generar las corrientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , observándose que fueran mayores de  $1 \text{ nA}$  y  $100 \text{ pA}$  respectivamente. Toda célula con valores menores a los antes mencionados fue excluida del análisis.

### 6.1 Reducción del componente activado por NMDA de la $I_{\text{Glut}}$ producido por la co-aplicación de 5-HT

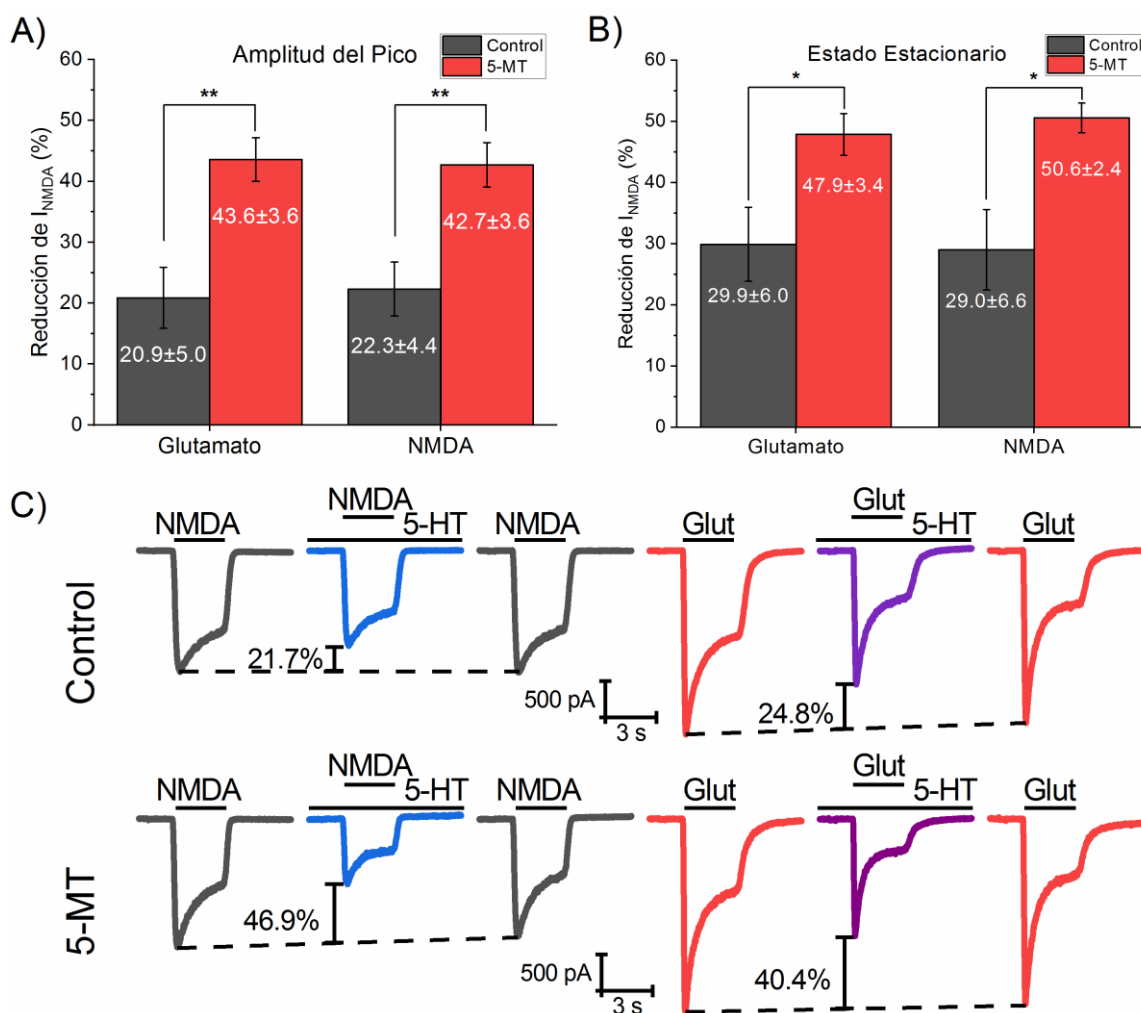
Con el fin de observar si existían diferencias en el efecto de la 5-HT entre los grupos experimentales, y, en caso de existir diferencia, realizar una primera aproximación a identificar cual componente de la  $I_{\text{Glut}}$  ( $I_{\text{NMDA}}$  o  $I_{\text{AMPA/Kainato}}$ ) se encuentra afectado por el tratamiento, se analizó el efecto de la 5-HT (30  $\mu\text{M}$ ) tanto en la amplitud del pico como en el EE de la  $I_{\text{Glut}}$  (100  $\mu\text{M}$ ). La amplitud del pico mostró una inhibición de  $12.08 \pm 1.75\%$  en el grupo control (n=9) y  $24.48 \pm 2.46\%$  en las crías de ratas tratadas (n=9), mientras que el EE redujo  $18.33 \pm 3.32\%$  y  $32.14 \pm 4.03\%$ , respectivamente (**Figura 18**). La diferencia entre ambos grupos fue significativa en ambos parámetros (Pico:  $t_{14.43} =$ ,  $p=0.001$ ; SS:  $t_{15.44} = 2.55$ ,  $p=0.02$ ). Durante el mismo protocolo se perfundió la célula con  $\text{Mg}^{++}$  (1 mM), un conocido bloqueador de la  $I_{\text{NMDA}}$  (Mayer *et al.*, 1984; Nowak *et al.*, 1984), en orden de estudiar la fracción remanente de la  $I_{\text{Glut}}$  y el efecto de la 5-HT en ella. De ésta manera, la aplicación de  $\text{Mg}^{++}$  en la  $I_{\text{Glut}}$  redujo la amplitud del pico en un  $94.01 \pm 1.09\%$  para el grupo control y  $94.68 \pm 0.82\%$  para el tratado con 5-MT, mientras que el EE redujo en  $91.31 \pm 2.22\%$  y  $91.04 \pm 0.97\%$ , respectivamente para los mismos grupos, sin mostrar diferencia significativa entre ellos (Pico:  $t_{14.94}$ ,  $p=0.49$ ; EE:  $t_{10.92} = -0.11$ ,  $p=0.911$ ). De manera similar, cuando el  $\text{Mg}^{++}$  se co-aplicó junto con 5-HT ni la amplitud del pico (Control:  $94.35 \pm 0.92$ ; 5-MT:  $94.74 \pm 0.95$ ), ni el EE (Control:  $92.38 \pm 1.87$ ; 5-MT:  $91.95 \pm 0.82$ ) mostraron diferencia significativa entre los grupos (Pico:  $t_{15.99} = 0.29$ ,  $p=0.78$ ; EE:  $t_{10.92} = -0.21$ ,  $p=0.84$ ). Cabe denotar que tampoco se encontró diferencia significativa en la amplitud del pico (Control:  $t_{15.59} = -0.24$ ,  $p=0.82$ ; 5-MT:  $t_{15.71} = -0.04$ ,  $p=0.97$ ) o el EE (Control:  $t_{15.56} = -0.36$ ,  $p=0.72$ ; 5-MT:  $t_{15.56} = -0.72$ ,  $p=0.48$ ) al comparar dentro del mismo grupo la  $I_{\text{Glut}}$  en presencia de  $\text{Mg}^{++}$  contra la  $I_{\text{Glut}}$  en presencia de la co-aplicación de  $\text{Mg}^{++}$  y 5-HT. En resumen, lo anterior sugiere que el tratamiento con 5-MT durante la gestación provoca un incremento de hasta dos veces del efecto inhibitorio de la 5-HT a lo largo de la corriente entera, afectando principalmente la modulación del componente mediado por los receptores activados por NMDA de la  $I_{\text{Glut}}$ .



**Figura 18:** Efecto de la 5-HT (30  $\mu$ M) tanto en la amplitud del pico como en el EE de la  $I_{Glut}$  (100  $\mu$ M) en presencia y ausencia de  $Mg^{++}$  (1 mM). La amplitud del pico (A) mostró una diferencia significativa ( $t_{14.43}=4.108$ ,  $p=0.001$ ) entre la inhibición de  $12.08 \pm 1.75\%$  del grupo control ( $n=9$ ) y la inhibición de  $24.48 \pm 2.46\%$  de las crías de las ratas tratadas ( $n=9$ ) cuando las células fueron perfundidas con 5-HT. Sin embargo, no se encontró diferencia entre los grupos cuando el  $Mg^{++}$  fue aplicado ( $t_{14.94}=0.49$ ,  $p=0.63$ ) o cuando se coaplicaron  $Mg^{++}$  y 5-HT ( $t_{15.99}=0.29$ ,  $p=0.78$ ). De manera similar, el EE (B) muestra diferencia significativa entre los grupos en presencia de 5-HT (Control:  $18.83 \pm 3.32\%$ ; 5-MT:  $32.14 \pm 4.03\%$ ;  $t_{15.44}=2.55$ ,  $p=0.02$ ), pero no cuando ésta se coaplica con  $Mg^{++}$  ( $t_{10.92}=-0.21$ ,  $p=0.84$ ) o en presencia de  $Mg^{++}$  solo ( $t_{10.92}=-0.11$ ,  $p=0.91$ ). De manera similar, no se encontró diferencia dentro de los grupos en la amplitud del pico (Control:  $t_{15.59}=-0.24$ ,  $p=0.82$ ; 5-MT Gest:  $t_{15.71}=-0.04$ ,  $p=0.97$ ) ni el EE (Control:  $t_{15.56}=-0.36$ ,  $p=0.72$ ; 5-MT Gest:  $t_{15.56}=-0.72$ ,  $p=0.48$ ) cuando se comparó la  $I_{Glut}$  en presencia de  $Mg^{++}$  contra la  $I_{Glut}$  en presencia de  $Mg^{++}$  y 5-HT coaplicadas. (C) Trazos representativos de la  $I_{Glut}$  en presencia y ausencia de 5-HT o  $Mg^{++}$ , así como en coaplicación de ambos. Código de Significancia:  $p < 0.001$  (\*\*\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.05$  (\*).

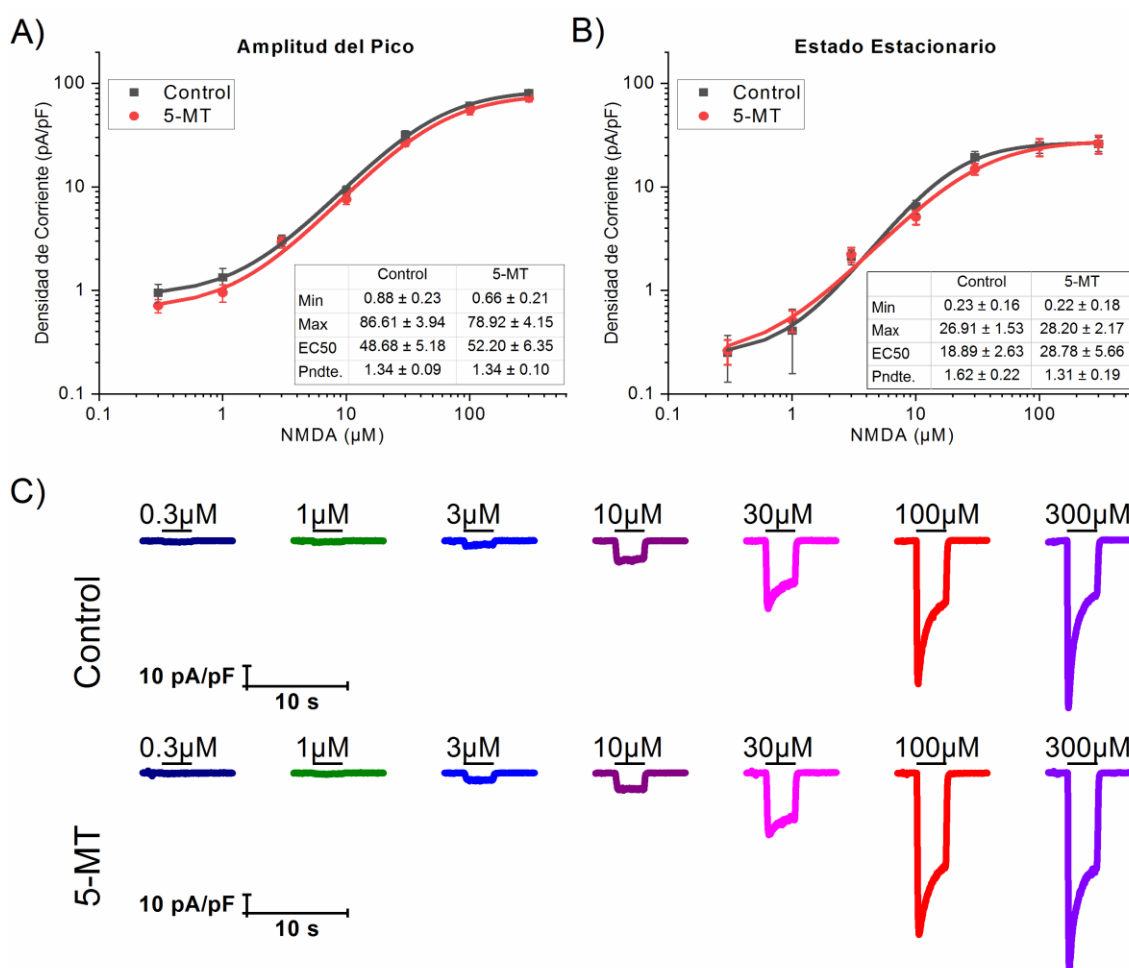
A manera de verificar que el componente de la  $I_{Glut}$  afectado por el tratamiento fuera el mediado por receptores de tipo NMDA, se comparó el efecto de la 5-HT sobre la  $I_{Glut}$  y la  $I_{NMDA}$  en la misma célula. El tratamiento con 5-MT causó un incremento significativo del efecto inhibitorio de la amplitud del pico tanto de la  $I_{Glut}$  ( $t_{3.52}=7.64$ ,  $p=0.008$ ) como de la  $I_{NMDA}$  ( $t_{3.74}=8.15$ ,  $p=0.005$ ) con respecto al grupo control. De manera similar, la inhibición serotoninérgica del EE se incrementó en ambas corrientes ( $I_{Glut}$ :  $t_{6.43}=-2.59$ ,  $p=0.04$ ;  $I_{NMDA}$ :  $t_{5.09}=-3.07$ ,  $p=0.02$ ). Cuando la 5-HT (30  $\mu$ M) se encontró presente en la solución, la  $I_{Glut}$

(100  $\mu\text{M}$ ) redujo un  $20.88\pm 5.01\%$  de la amplitud del pico y un  $29.90\pm 6.06\%$  del EE en el grupo control, mientras que en el grupo 5-MT la reducción fue de  $42.73\pm 3.65\%$  y  $47.87\pm 3.41$ , respectivamente. De manera similar, la  $I_{\text{NMDA}}$  (100  $\mu\text{M}$ ) redujo  $22.3\pm 4.43\%$  en la amplitud del pico del grupo control y  $43.58\pm 3.58\%$  en las tratadas, mientras que el EE redujo  $29.02\pm 6.57\%$  y  $50.56\pm 2.43\%$ , respectivamente, en presencia de 5-HT (**Figura 19**). Adicionalmente, la inhibición de la  $I_{\text{Glut}}$  y la  $I_{\text{NMDA}}$  causadas por 5-HT en la misma célula no exhibió diferencia estadísticamente significativa entre ellas en la amplitud del pico (Control,  $t_4=0.52$ ,  $p=0.63$ ; 5-MT,  $t_5=0.24$ ,  $p=0.82$ ) ni en su EE (Control  $t_4=-0.19$ ,  $p=0.86$ ; 5-MT  $t_5=0.7153$ ,  $p=0.51$ ). Indicando lo anterior que la 5-HT modula en la misma proporción a la  $I_{\text{Glut}}$  y la  $I_{\text{NMDA}}$ .



**Figura 19:** Efecto de la 5-HT (30  $\mu\text{M}$ ) en la  $I_{\text{Glut}}$  y  $I_{\text{NMDA}}$ . El tratamiento con 5-MT causa un incremento significativo del efecto inhibitorio de la 5-HT sobre la amplitud del pico (A) de ambas corrientes, la  $I_{\text{Glut}}$  ( $t_{3.52}=7.64$ ,  $p=0.008$ ) y la  $I_{\text{NMDA}}$  ( $t_{3.74}=8.15$ ,  $p=0.005$ ), respecto al grupo control. El EE (B) muestra un incremento similar ( $I_{\text{Glut}}$ :  $t_{6.43}=-2.59$ ,  $p=0.04$ ;  $I_{\text{NMDA}}$ :  $t_{5.09}=-3.07$ ,  $p=0.02$ ). Por otra parte, la inhibición causada por la 5-HT en la  $I_{\text{Glut}}$  y la  $I_{\text{NMDA}}$  en la misma célula no muestra diferencia significativa ni en la amplitud del pico (Control,  $t_4=0.52$ ,  $p=0.63$ ; 5-MT,  $t_5=0.24$ ,  $p=0.82$ ), ni en el EE (Control  $t_4=-0.19$ ,  $p=0.86$ ; 5-MT  $t_5=0.7153$ ,  $p=0.51$ ). (C) Trazos representativos de la  $I_{\text{Glut}}$  y la  $I_{\text{NMDA}}$ , ambos en presencia y ausencia de 5-HT en la misma célula. Código de Significancia:  $p<0.001$  (\*\*\*),  $p<0.01$  (\*\*),  $p<0.05$  (\*)

Una vez que se identificó que la corriente mediada por el receptor NMDA era el componente de la  $I_{\text{Glut}}$  principalmente afectado por el tratamiento, se buscó el comprobar que los cambios observados se debieran a una alteración en la modulación serotoninérgica de la corriente y no debido a cambios en la  $I_{\text{NMDA}}$  por sí misma. Para esto se realizó en ambos grupos una curva dosis-respuesta de NMDA desde 0.3  $\mu\text{M}$  hasta 300  $\mu\text{M}$ . Para cada concentración se analizó la amplitud del pico y el EE de las corrientes (**Tabla 2**), posteriormente los datos fueron ajustados a una curva sigmoidea (**Figura 20**) y se compararon con una prueba F. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos a nivel de la amplitud ( $F_{4,119} = 2.07$ ,  $p = 0.09$ ) del pico o el EE ( $F_{4,119} = 0.61$ ,  $p = 0.65$ )



**Figura 20:** Curvas dosis-respuesta de NMDA desde 0.3  $\mu\text{M}$  hasta 300  $\mu\text{M}$  para ambos grupos. Se analizó la amplitud del pico (A) y el EE (B) de las corrientes en cada concentración, posteriormente los datos se ajustaron a una función logística (línea continua) y se compararon los ajustes con una prueba F. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos (Pico:  $F_{4,119} = 2.07$ ,  $p = 0.09$ ; EE:  $F_{4,119} = 0.61$ ,  $p = 0.65$ ). (C) Trazos representativos de la  $I_{\text{NMDA}}$  para cada concentración en cada uno de los grupos.

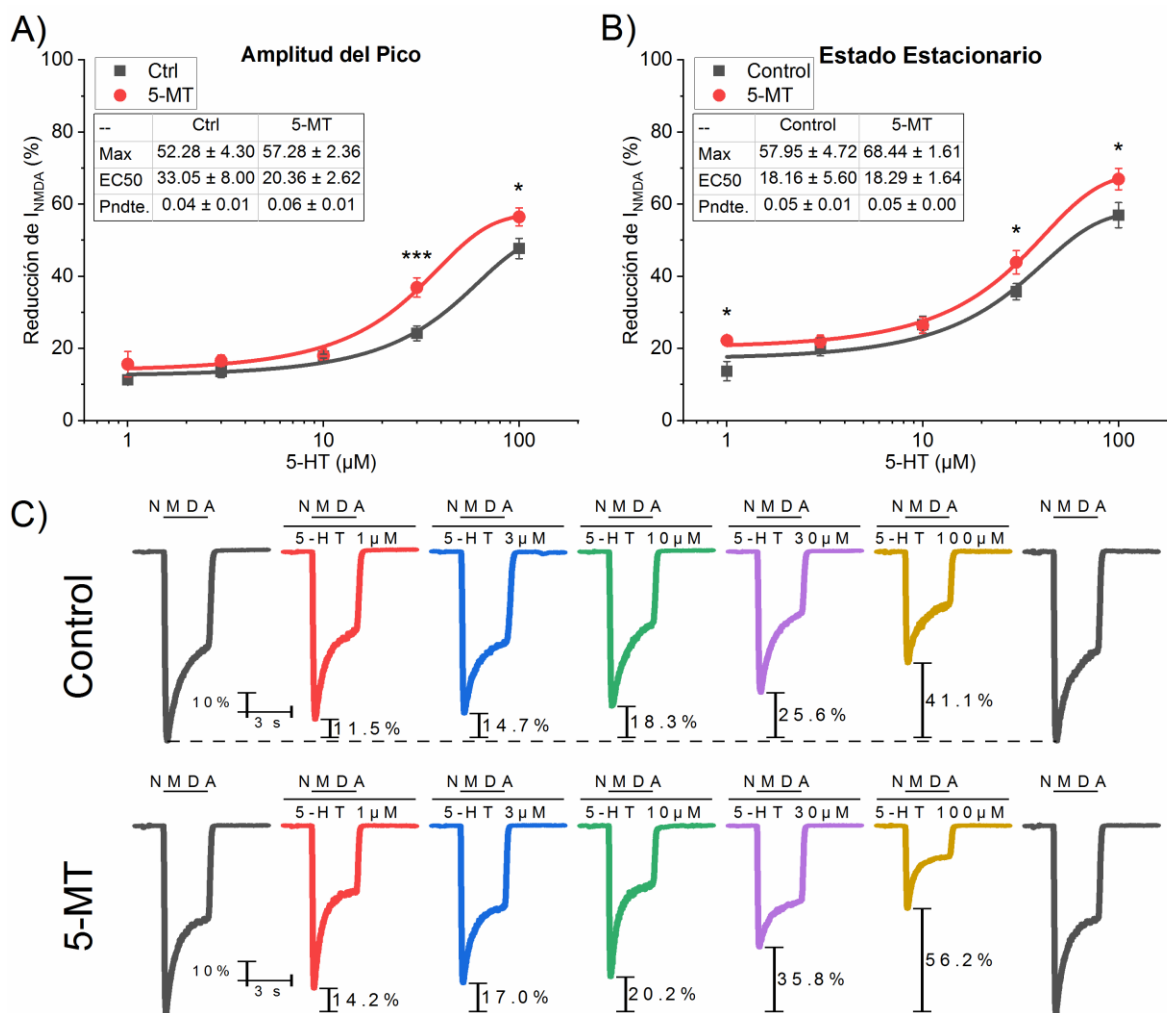
**Tabla 2:** Amplitud del pico y estado estacionario de la corrientes para cada concentración de NMDA.

NMDA( $\mu$ M)	Amplitud del Pico (pA/pF)		Estado-Estacionario (pA/pF)	
	Control	5-MT	Control	5-MT
<b>0.3</b>	-0.95 $\pm$ 0.20 (9)	-0.71 $\pm$ 0.11 (7)	-0.25 $\pm$ 0.13 (9)	-0.26 $\pm$ 0.08 (7)
<b>1</b>	-1.34 $\pm$ 0.30 (9)	-0.95 $\pm$ 0.19 (9)	-0.41 $\pm$ 0.27 (9)	-0.52 $\pm$ 0.13 (9)
<b>3</b>	-3.05 $\pm$ 0.38 (8)	-2.95 $\pm$ 0.40 (9)	-2.13 $\pm$ 0.37 (8)	-2.24 $\pm$ 0.38 (9)
<b>10</b>	-9.26 $\pm$ 0.97 (9)	-7.61 $\pm$ 0.88 (9)	-6.47 $\pm$ 1.00 (9)	-5.12 $\pm$ 0.84 (9)
<b>30</b>	-31.85 $\pm$ 3.08 (9)	-26.74 $\pm$ 2.22 (9)	-19.42 $\pm$ 2.76 (9)	-14.90 $\pm$ 1.95 (9)
<b>100</b>	-61.18 $\pm$ 4.27 (9)	-55.34 $\pm$ 6.05 (9)	-25.25 $\pm$ 4.36 (9)	-24.54 $\pm$ 5.00 (9)
<b>300</b>	-80.80 $\pm$ 3.88 (9)	-72.21 $\pm$ 6.24 (9)	-26.11 $\pm$ 4.35 (9)	-26.20 $\pm$ 5.57 (9)

Entre paréntesis se muestra el número de células registradas para cada grupo y concentración de NMDA

## 6.2 Cambios en la Modulación Serotoninérgica de la $I_{NMDA}$

De manera subsecuente, ya que no se encontró diferencia significativa en la  $I_{NMDA}$  entre los grupos, se realizó una curva dosis respuesta del efecto de 5-HT (desde 1  $\mu$ M hasta 100  $\mu$ M) sobre la  $I_{NMDA}$  (100  $\mu$ M). Para esta curva se usaron un total de 54 células, 33 del grupo control y 21 del grupo tratado. Cada célula fue expuesta a un máximo de 3 concentraciones de 5-HT aplicadas en orden aleatorio. La amplitud del pico y el EE fueron analizados (**Tabla 3**), ajustados a una curva sigmoidea con el valor mínimo fijado en cero (**Figura 21**), y finalmente comparados con una prueba F. De este modo, se encontró diferencia significativa entre los grupos tanto a nivel de la amplitud del pico ( $F_{3,125}=10.36$ ,  $p<0.001$ ), como del EE ( $F_{3,125}=4.23$ ,  $p=0.007$ ). De igual manera, se evaluó la diferencia entre los grupos para cada concentración, encontrándose un incremento significativo con respecto al grupo control del efecto inhibitor de la 5-HT sobre la  $I_{NMDA}$ , para la amplitud del pico en las concentraciones de 30  $\mu$ M ( $t_{25,57}=-4.42$ ,  $p<0.001$ ) y 100  $\mu$ M ( $t_{23,01}=-2.33$ ,  $p=0.03$ ), y para el EE en las concentraciones de 1  $\mu$ M ( $t_{15,48}=-2.88$ ,  $p=0.01$ ), 30  $\mu$ M ( $t_{26,74}=-2.07$ ,  $p=0.048$ ) y 100  $\mu$ M ( $t_{22,14}=-2.18$ ,  $p=0.04$ ).



**Figura 21:** Curva dosis-respuesta del efecto de 5-HT desde 1  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  sobre la  $I_{\text{NMDA}}$  (100  $\mu\text{M}$ ). Los datos se analizaron, ajustaron (línea continua) y compararon con una prueba F. De esta manera se encontró una diferencia significativa entre los grupos tanto a nivel de la amplitud del pico (A;  $F_{3,125}=10.36$ ,  $p<0.001$ ) como del EE (B;  $F_{3,125}=4.23$ ,  $p=0.007$ ). De igual manera, la diferencia entre grupos para cada concentración fue evaluada, encontrándose diferencia significativa para la amplitud del pico en las concentraciones de 30  $\mu\text{M}$  ( $t_{25.57}=-4.42$ ,  $p<0.001$ ) y 100  $\mu\text{M}$  ( $t_{23.01}=-2.33$ ,  $p=0.03$ ), y para el EE en las concentraciones de 1  $\mu\text{M}$  ( $t_{15.48}=-2.88$ ,  $p=0.01$ ), 30  $\mu\text{M}$  ( $t_{26.74}=-2.07$ ,  $p=0.048$ ) y 100  $\mu\text{M}$  ( $t_{22.14}=-2.18$ ,  $p=0.04$ ). (C) Trazos representativos de la  $I_{\text{NMDA}}$  en presencia de las distintas concentraciones de 5-HT usadas durante el protocolo normalizados cada uno de acuerdo a sus respectivas condiciones de referencia (ausencia de 5-HT). Código de Significancia:  $p<0.001$  (\*\*\*),  $p<0.01$  (\*\*),  $p<0.05$  (\*)

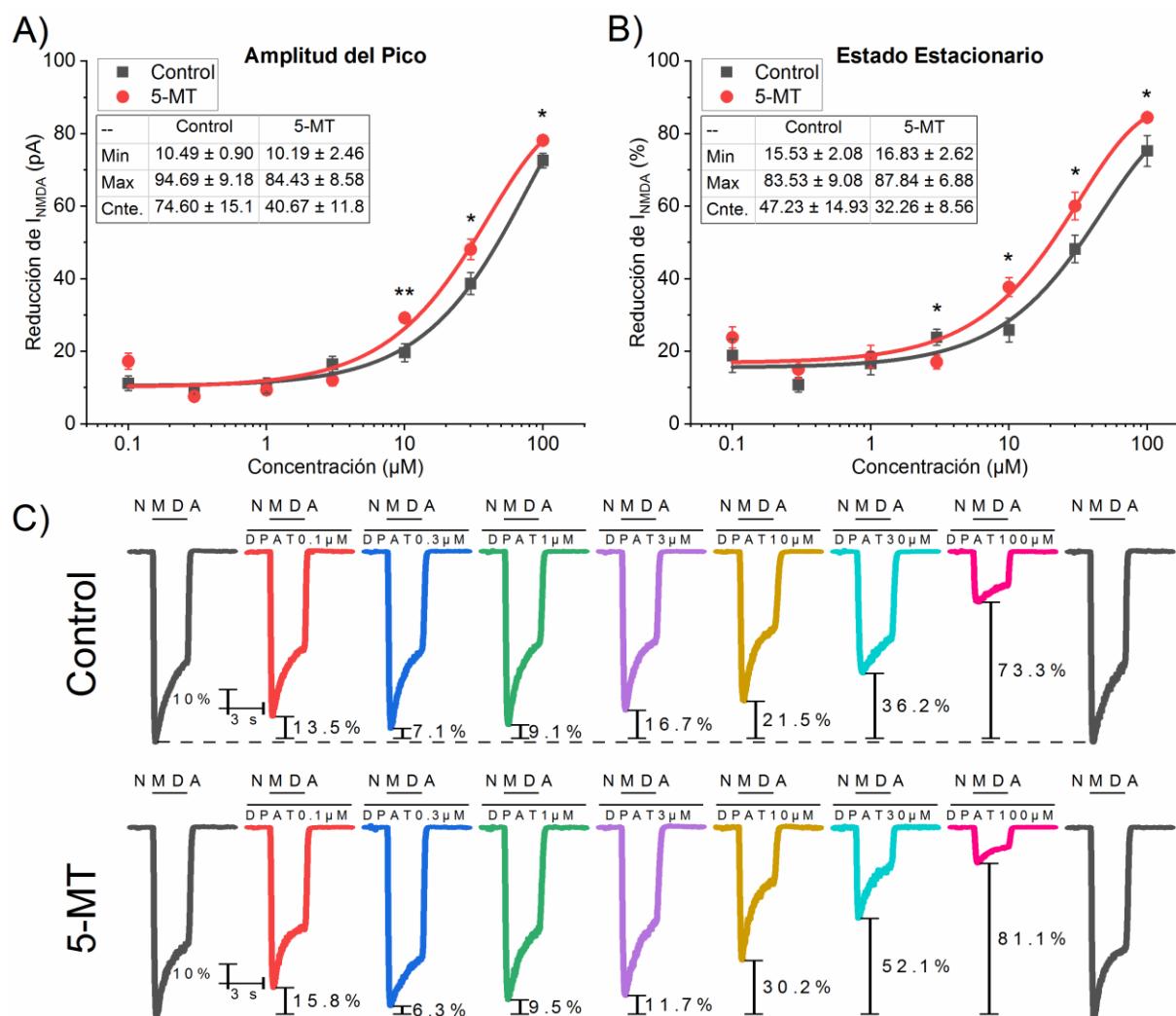
**Tabla 3:** Comparación entre grupos del porcentaje de inhibición de la amplitud del pico y el estado estacionario de la  $I_{NMDA}$  para cada concentración de 5-HT.

5-HT ( $\mu\text{M}$ )	Inhibición de la Amplitud del Pico (%)			Inhibición del Estado-Estacionario (%)		
	Control	5-MT	P(< t )	Control	5-MT	P(< t )
1	11.33±0.90 (13)	15.68±3.51 (7)	ns.	13.73±2.69 (13)	22.24±1.22 (7)	*
3	13.64±1.65 (9)	16.63±1.57 (13)	ns.	20.44±2.45 (9)	21.97±1.73 (13)	ns.
10	17.88±0.50 (14)	18.05±1.94 (11)	ns.	26.64±2.33 (14)	26.38±2.23 (11)	ns.
30	24.23±2.06 (16)	36.92±2.69 (16)	***	35.77±2.29 (16)	46.94±3.29 (16)	*
100	47.75±2.81 (12)	56.51±2.48 (14)	*	56.99±3.48 (12)	66.98±2.98 (14)	*

Entre paréntesis se muestra el número de células registradas para cada grupo y concentración de 5-HT. Código de Significancia:  $p < 0.001$  (\*\*\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.05$  (\*),  $p > 0.05$  (ns.).

### 6.2.1 Cambios en la Modulación de la $I_{NMDA}$ Mediada por el Receptor 5-HT<sub>1A</sub>

Una vez que se corroboró la diferencia entre los grupos en la modulación serotoninérgica de la  $I_{NMDA}$ , se buscó identificar cuál de los dos receptores a 5-HT más abundantes en las neuronas piramidales de la CPF (Puig & Gullledge, 2011) se encontraba afectado por el tratamiento con 5-MT durante la gestación. Con este fin, se inició con una curva dosis-respuesta del efecto en la  $I_{NMDA}$  (100  $\mu\text{M}$ ) de la aplicación desde 0.1  $\mu\text{M}$  hasta 100  $\mu\text{M}$  de 8-OH-DPAT, agonista selectivo del receptor 5-HT<sub>1A</sub>. Para la realización de dicha curva, se ocuparon un total de 45 células, 20 procedentes del grupo Control y 25 más provenientes del grupo tratado con 5-MT durante la gestación. Estas células, del mismo modo que las utilizadas en el protocolo anterior, fueron expuesta a un máximo de 3 concentraciones del fármaco, 8-OH-DPAT, aplicadas en orden aleatorio. Los datos de amplitud del pico y SS de la  $I_{NMDA}$  en presencia y ausencia de las distintas concentraciones de 8-OH-DPAT fueron analizados (Tabla 4) y el porcentaje de inhibición de ambos grupos se ajustó a una curva de crecimiento exponencial (Figura 22). Posteriormente las curvas fueron comparadas con una prueba F, con la cual se encontró una diferencia significativa tanto para la amplitud del pico ( $F_{3,134}=6.35$ ,  $p < 0.001$ ) como para el EE ( $F_{3,134}=5.31$ ,  $p=0.002$ ). Por otra parte, al evaluarse la diferencia entre los grupos para cada concentración, se encontraron diferencias significativas en la amplitud del pico a partir de la concentración de 10  $\mu\text{M}$  (10  $\mu\text{M}$ :  $t_{11.54}=-3.49$ ,  $p=0.004$ ; 30  $\mu\text{M}$ :  $t_{17.52}=-2.28$ ,  $p=0.03$ ; 100  $\mu\text{M}$ :  $t_{10.46}=-2.33$ ,  $p=0.04$ ) y a partir de 3  $\mu\text{M}$  para el EE (3  $\mu\text{M}$ :  $t_{13.69}=2.33$ ,  $p=0.04$ ; 10  $\mu\text{M}$ :  $t_{15.71}=-2.81$ ,  $p=0.01$ ; 30  $\mu\text{M}$ :  $t_{16}=-2.21$ ,  $p=0.04$ ; 100  $\mu\text{M}$ :  $t_{6.98}=-2.64$ ,  $p=0.03$ ).



**Figura 22:** Curva dosis-respuesta del efecto en la  $I_{NMDA}$  ( $100 \mu M$ ) de la aplicación desde  $0.1 \mu M$  hasta  $100 \mu M$  de 8-OH-DPAT. Los datos de amplitud del pico (A) y SS (B) en presencia de 8-OH-DPAT fueron analizados y ajustados a curva de crecimiento exponencial (línea continua). Las curvas fueron comparadas con una prueba F, con la cual se encontró una diferencia significativa tanto para la amplitud del pico ( $F_{3,134}=6.35$ ,  $p<0.001$ ) como para el EE ( $F_{3,134}=5.31$ ,  $p=0.002$ ). Posteriormente se evaluó la diferencia entre los grupos para cada concentración, encontrándose diferencias significativas para la amplitud del pico en las concentraciones de  $10 \mu M$  ( $t_{11,54}=-3.49$ ,  $p=0.004$ ),  $30 \mu M$  ( $t_{17,52}=-2.28$ ,  $p=0.03$ ) y  $100 \mu M$  ( $t_{10,46}=-2.33$ ,  $p=0.04$ ). De igual manera, las concentraciones de  $3 \mu M$  ( $t_{13,69}=2.33$ ,  $p=0.04$ ),  $10 \mu M$  ( $t_{15,71}=-2.81$ ,  $p=0.01$ ),  $30 \mu M$  ( $t_{16}=-2.21$ ,  $p=0.04$ ), y  $100 \mu M$  ( $t_{6,98}=-2.64$ ,  $p=0.03$ ) presentaron diferencia entre los grupos a nivel del EE. (C) Trazos representativos de la  $I_{NMDA}$  en presencia de las distintas concentraciones de 8-OH-DPAT usadas durante el protocolo, normalizados cada uno de acuerdo a sus respectivas condiciones de referencia (ausencia de 8-OH-DPAT). Código de Significancia:  $p<0.001$  (\*\*\*),  $p<0.01$  (\*\*),  $p<0.05$  (\*).

**Tabla 4:** Comparación entre grupos del porcentaje de inhibición de la amplitud del pico y el estado estacionario de la  $I_{NMDA}$  para cada concentración de 8-OH-DPAT.

8-OH-DPAT ( $\mu$ M)	Inhibición de la Amplitud del Pico (%)			Inhibición del Estado-Estacionario (%)		
	Control	5-MT	P(< t )	Control	5-MT	P(< t )
0.1	11.20±1.97 (8)	17.30±2.19 (11)	ns.	18.85±4.60 (8)	23.86±2.89 (11)	ns.
0.3	9.68±0.79 (9)	7.58±1.34 (13)	ns.	10.81±1.98 (9)	15.05±2.57 (13)	ns.
1	10.59±2.10 (8)	9.38±1.40 (11)	ns.	16.70±3.15 (8)	18.57±3.09 (11)	ns.
3	16.49±2.19 (7)	12.09±1.58 (11)	ns.	23.89±2.22 (7)	17.06±1.91 (11)	*
10	19.64±2.48 (9)	29.25±1.19 (10)	**	25.90±3.30 (9)	37.74±2.62 (10)	*
30	38.70±3.00 (9)	48.15±2.84 (11)	*	48.25±3.78 (9)	60.08±3.78 (11)	*
100	72.62±2.02 (7)	78.17±1.25 (10)	*	75.25±4.28 (7)	84.49±0.96 (10)	*

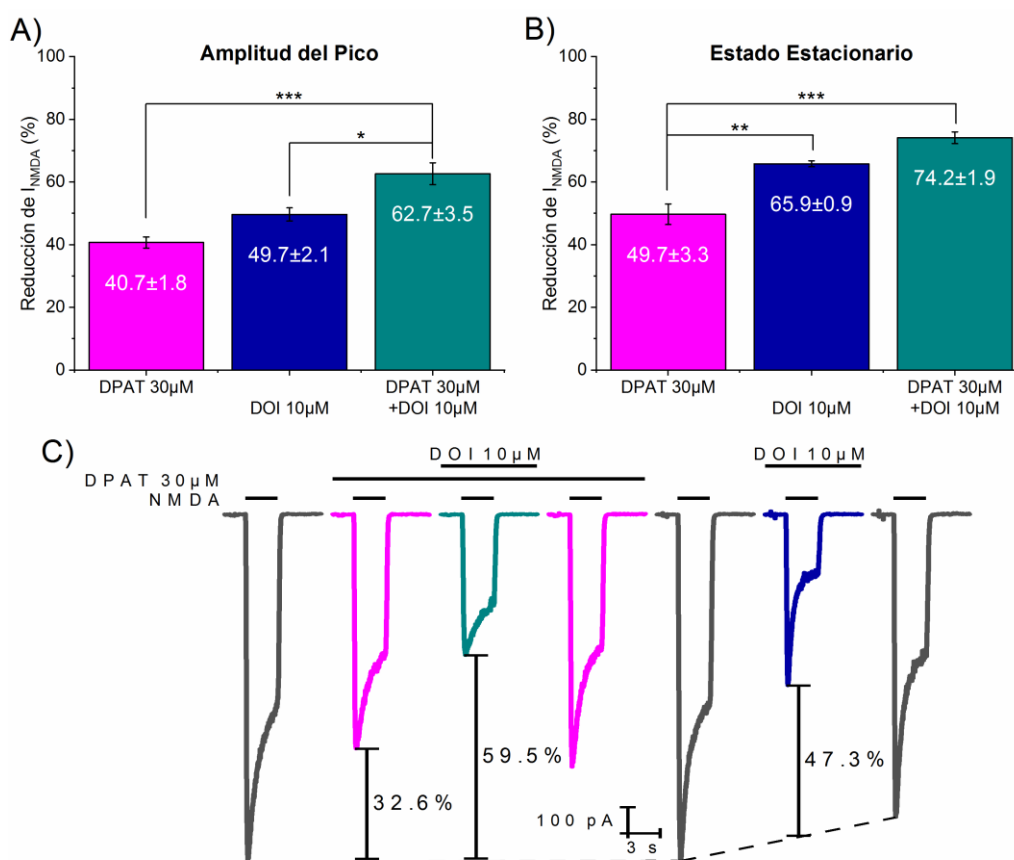
Entre paréntesis se muestra el número de células registradas para cada grupo y concentración de 8-OH-DPAT. Código de Significancia:  $p < 0.001$  (\*\*\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.05$  (\*),  $p > 0.05$  (ns.)

### 6.2.2 Modulación de la $I_{NMDA}$ Mediada por el Receptor 5-HT<sub>2A</sub>

Posterior a la realización de la curva dosis-respuesta del efecto del 8-OH-DPAT sobre la  $I_{NMDA}$  y en continuación con el objetivo de identificar el receptor a 5-HT afectado por el tratamiento, se procedió a analizar los cambios en la modulación de la  $I_{NMDA}$  ejercida por el receptor 5-HT<sub>2A</sub>.

De acuerdo al trabajo de Yuen y colaboradores (2008) la activación del receptor 5-HT<sub>2A/C</sub> por sí solo no afecta directamente la  $I_{NMDA}$  sino que se contrapone al efecto modulador del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en la  $I_{NMDA}$ . Por tanto, lo primero que se realizó fue un análisis del efecto modulador en la  $I_{NMDA}$  (100  $\mu$ M) de la activación del receptor 5-HT<sub>2A</sub> por medio de la aplicación de DOI (10  $\mu$ M), un agonista del receptor 5-HT<sub>2A/C</sub>, en presencia y ausencia de 30  $\mu$ M de 8-OH-DPAT (**Figura 23**). A través de ésta metodología se encontró un efecto inhibitorio de la  $I_{NMDA}$  tanto al aplicar 8-OH-DPAT (Pico: 40.74±1.76%; EE: 49.75±3.29%) como al aplicar DOI (Pico: 49.68±2.11%; EE: 65.88±0.94%), así como un efecto aditivo al co-aplicarse ambos fármacos (inhibición de Pico: 62.68±3.49%; Inhibición de EE: 74.18±1.85%). Posterior al cálculo de los porcentajes de inhibición de la  $I_{NMDA}$  (**Tabla 5**), los mismos se analizaron por medio de una ANOVA univariada de una sola vía. Se encontró diferencia significativa tanto a nivel del pico ( $F_{2,14}=18.65$ ,  $p < 0.001$ ) como del estado estacionario ( $F_{2,14}=27.18$ ,  $p < 0.001$ ). La post-prueba de comparación múltiple de Tukey (**Tabla 6**) reveló que tanto a nivel de la amplitud del pico como del EE existe una diferencia significativa

entre la aplicación del 8-OH-DPAT y su co-aplicación con DOI (Pico:  $q = 8.59$ ,  $p < 0.001$ ; EE:  $q = 10.16$ ,  $p < 0.001$ ), sin embargo, la comparativa entre las aplicaciones por separado de 8-OH-DPAT y DOI, únicamente presentó diferencia significativa a nivel del EE ( $q = 6.71$ ,  $p = 0.001$ ). En contraparte, la comparativa entre la aplicación de DOI y la co-aplicación de 8-OH-DPAT con DOI, solamente fue significativo a nivel de la amplitud del pico ( $q = 4.85$ ,  $p = 0.01$ ). Cabe mencionar que el efecto inhibitorio de la  $I_{NMDA}$  por parte de DOI al encontrarse coaplicada con 8-OH-DPAT es del  $37.60 \pm 4.06\%$  y  $35.04 \pm 7.28\%$  en la amplitud del pico y el EE respectivamente, lo que sugiere que DOI realiza gran parte de su efecto inhibitorio de manera independiente a la aplicación del agonista del receptor 5-HT<sub>1A</sub>.



**Figura 23:** Efecto de DPAT (30  $\mu$ M), DOI (10  $\mu$ M) y su co-aplicación (DPAT 30  $\mu$ M + DOI 10  $\mu$ M) en la  $I_{NMDA}$  (100  $\mu$ M). Se encontró un efecto inhibitorio de la  $I_{NMDA}$  tanto al aplicar 8-OH-DPAT como al aplicar DOI, así como un efecto aditivo al co-aplicarse ambos fármacos. Al analizar los porcentajes de inhibición por medio de una ANOVA correspondiente, se encontraron diferencias significativas tanto a nivel del pico ( $F_{2,14} = 18.65$ ,  $p < 0.001$ ) como del estado estacionario ( $F_{2,14} = 27.18$ ,  $p < 0.001$ ). La post-prueba de Tukey reveló que tanto a nivel de la amplitud del pico como del EE existe una diferencia significativa entre la aplicación del 8-OH-DPAT y su co-aplicación con DOI (Pico:  $q = 8.59$ ,  $p < 0.001$ ; EE:  $q = 10.16$ ,  $p < 0.001$ ), sin embargo, la comparativa entre las aplicaciones por separado de 8-OH-DPAT y DOI únicamente presentó diferencia significativa a nivel del EE ( $q = 6.71$ ,  $p = 0.001$ ). En contraparte, la comparativa entre la aplicación de DOI y la co-aplicación de 8-OH-DPAT con DOI, solamente fue significativo a nivel de la amplitud del pico ( $q = 4.85$ ,  $p = 0.01$ ). (C) Trazos representativos de la  $I_{NMDA}$  en presencia de 8-OH-DPAT, DOI y su co-aplicación de acuerdo al protocolo utilizado para su registro. Código de Significancia:  $p < 0.001$  (\*\*\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.05$  (\*).

**Tabla 5:** Porcentaje de inhibición de la amplitud del pico y el estado estacionario de la  $I_{NMDA}$  en presencia de 8-OH-DPAT (30  $\mu$ M), DOI (10  $\mu$ M) y su co-aplicación. Se presenta también el porcentaje de inhibición de DOI tomando como línea base el efecto de 8-OH-DPAT al ser coaplicados.

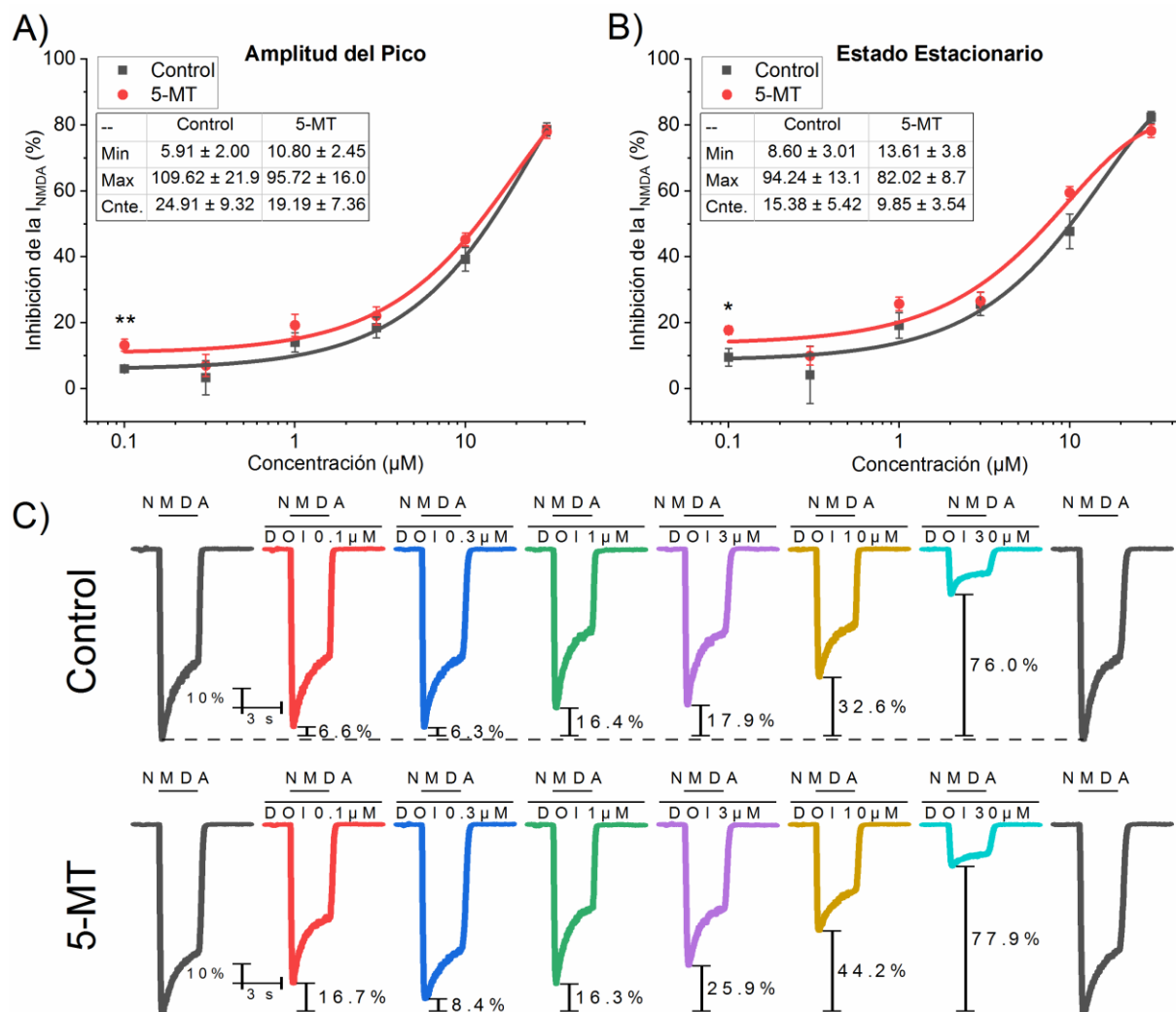
	<b>Inhibición de la Amplitud del Pico (%)</b>	<b>Inhibición del Estado-Estacionario (%)</b>
8-OH-DPAT	40.74 $\pm$ 1.76 (6)	49.75 $\pm$ 3.29 (6)
DOI	49.68 $\pm$ 2.11 (6)	65.88 $\pm$ 0.94 (6)
8-OH-DPAT + DOI	62.68 $\pm$ 3.49 (6)	74.18 $\pm$ 1.85 (6)
DOI (a partir de 8-OH DPAT)	37.60 $\pm$ 4.06	35.04 $\pm$ 7.28

**Tabla 6:** Resumen de los resultados de las post-pruebas de comparación múltiple de Tukey utilizadas para comparar la inhibición de la  $I_{NMDA}$  tanto a nivel de la amplitud del pico como del estado estacionario causada por 8-OH-DPAT (30  $\mu$ M), DOI (10  $\mu$ M) y su co-aplicación.

	<b>Amplitud del Pico</b>		<b>Estado-Estacionario</b>	
	<b>q</b>	<b>P(&lt; q )</b>	<b>q</b>	<b>P(&lt; q )</b>
8-OH-DPAT Vs. DOI	3.34	ns.	6.71	**
8-OH-DPAT + DOI Vs. 8-OH-DPAT	8.59	***	10.16	***
8-OH-DPAT + DOI Vs. DOI	4.85	*	3.3	n.s

Código de Significancia:  $p < 0.001$  (\*\*\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.05$  (\*),  $p > 0.05$  (ns.)

Ya que se encontró independencia del efecto modulador en la  $I_{NMDA}$  ante la aplicación de DOI, se decidió analizar dicho efecto modulador a través de una curva dosis-respuesta del efecto de este fármaco en la  $I_{NMDA}$  (100  $\mu$ M), utilizando concentraciones de DOI en un rango desde 0.1  $\mu$ M hasta 30  $\mu$ M (0.1  $\mu$ M, 0.3  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 10  $\mu$ M y 30  $\mu$ M). La realización de esta curva conllevó el uso de un total de 46 células, 19 del grupo Control y 27 del grupo tratado con 5-MT. De manera individual, cada célula fue expuesta a un máximo de 3 concentraciones de fármaco aplicadas en orden aleatorio. De las  $I_{NMDA}$  registradas de estas células en presencia y ausencia de DOI, se analizó la amplitud del pico y su estado estacionario (**Tabla 7**). Posteriormente, los datos del porcentaje de inhibición de ambos parámetros en cada grupo se ajustaron a una curva de crecimiento exponencial (**Figura 24**) y se compararon con una prueba F. Siguiendo el procedimiento anterior, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos a nivel de la amplitud del pico ( $F_{3,136}=2.32$ ,  $p=0.08$ ) ni el EE ( $F_{3,136}=2.46$ ,  $p=0.06$ ). Finalmente, al momento de evaluar en cada concentración la diferencia entre los grupos, se encontró que existía diferencia significativa en la concentración de 0.1  $\mu$ M tanto a nivel de la amplitud del pico ( $t_{15,29}=-3.57$ ,  $p=0.003$ ) como del EE ( $t_{8,60}=-2.82$ ,  $p=0.02$ ).



**Figura 24:** Curva dosis-respuesta del efecto en la  $I_{NMDA}$  (100  $\mu$ M) de la aplicación de DOI desde 0.1  $\mu$ M hasta 30  $\mu$ M. Los datos de amplitud del pico (A) y EE (B) fueron analizados, ajustados a una función de crecimiento exponencial (línea continua) y finalmente comparados mediante una prueba F. Siguiendo este procedimiento no se encontraron diferencias significativas para ninguno de los dos parámetros analizados (Pico:  $F_{3,136}=2.32$ ,  $p=0.08$ ; EE:  $F_{3,136}=2.46$ ,  $p=0.06$ ). Posteriormente, se evaluó la diferencia entre los grupos en cada concentración, encontrándose diferencia significativa en la concentración de 0.1  $\mu$ M a nivel de la amplitud del pico ( $t_{15,29}=-3.57$ ,  $p=0.003$ ) y el EE ( $t_{8,60}=-2.82$ ,  $p=0.02$ ). (C) Trazos representativos de la  $I_{NMDA}$  en presencia de DOI en las distintas concentraciones usadas (desde 0.1  $\mu$ M hasta 30  $\mu$ M), normalizados cada uno de acuerdo a sus respectivas condiciones de referencia (ausencia de DOI). Código de Significancia:  $p<0.001$  (\*\*\*),  $p<0.01$  (\*\*),  $p<0.05$  (\*).

**Tabla 7:** Comparación entre grupos del porcentaje de inhibición de la amplitud del pico y el estado estacionario de la  $I_{NMDA}$  para cada concentración de DOI

<b>DOI (<math>\mu M</math>)</b>	<b>Inhibición de la Amplitud del Pico (%)</b>			<b>Inhibición del Estado-Estacionario (%)</b>		
	<b>Control</b>	<b>5-MT</b>	<b>P(&lt; t )</b>	<b>Control</b>	<b>5-MT</b>	<b>P(&lt; t )</b>
0.1	6.04±0.88 (7)	13.20±1.80 (13)	**	9.52±2.65 (7)	17.75±1.22 (13)	*
0.3	3.33±5.20 (12)	7.04±3.36 (14)	ns.	4.21±8.75 (12)	9.95±2.79 (14)	ns.
1	14.04±2.95 (7)	19.25±3.35 (13)	ns.	19.19±3.86 (7)	25.73±2.09 (13)	ns.
3	18.53±3.15 (12)	22.09±2.71 (14)	ns.	25.68±3.54 (12)	26.63±2.73 (14)	ns.
10	39.26±3.60 (7)	45.26±1.95 (13)	ns.	47.74±5.27 (7)	59.46±1.91 (13)	ns.
30	78.27±1.98 (12)	77.95±1.97 (14)	ns.	82.41±1.75 (12)	78.23±1.94 (14)	ns.

Entre paréntesis se muestra el número de células registradas para cada grupo y concentración de DOI.  
Código de Significancia:  $p < 0.001$  (\*\*\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.05$  (\*),  $p > 0.05$  (ns.)

## 7 DISCUSIÓN

---

El presente estudio se enfocó en los cambios en la respuesta moduladora de la 5-HT en las  $I_{\text{Glut}}$  de neuronas piramidales de la capa V-VI de la corteza prefrontal de las crías de rata tratadas con el agonista serotoninérgico 5-MT durante la gestación. Nuestros datos muestran que las crías de ratas tratadas con 5-MT (sc. 1mg/kg/day) desde el GD11 hasta el GD21, presentan diferencias significativas con respecto a los controles en la amplitud del pico y el EE de la  $I_{\text{Glut}}$  en presencia de 5-HT. Dichas diferencias en la  $I_{\text{Glut}}$  en presencia de 5-HT son debidas a la inhibición del componente de la  $I_{\text{Glut}}$  dependiente de los receptores de tipo NMDA. Sin embargo, la  $I_{\text{NMDA}}$  no se encuentra por si misma afectada por el tratamiento, sino que es su modulación serotoninérgica la que se encuentra afectada. De manera particular, al analizar por separado la modulación serotoninérgica mediada por los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A</sub>, se encontró que la modulación ejercida por el receptor 5-HT<sub>1A</sub> tanto a nivel de la amplitud del pico como del EE se encuentra aumentada, a diferencia de la modulación mediada por el receptor 5-HT<sub>2A</sub> la cual permaneció sin cambios significativos.

De éste modo, lo primero que podemos mencionar sobre nuestros resultados, es que corrobora la noción de que el efecto de la 5-HT sobre las  $I_{\text{Glut}}$  en las neuronas piramidales de la CPF, es principalmente inhibitorio (Puig, Celada, *et al.*, 2004). Aunado a esto, resaltamos el hecho de que el tratamiento con 5-MT afecta principalmente el efecto modulador de la 5-HT sobre el componente de la  $I_{\text{Glut}}$  activado por los receptores NMDA y que dicha alteración es al alza, es decir, incrementa el efecto inhibitorio de la 5-HT sobre dicha corriente.

Al analizar el efecto modulador de la 5-HT sobre la  $I_{\text{Glut}}$ , y en particular sobre la  $I_{\text{NMDA}}$ , se encontraron diferencias significativas entre el grupo administrado durante la gestación con 5-MT y aquel administrado con solución salina, tanto en la reducción de la amplitud del pico, como en la reducción del EE. Estos cambios, aluden a una alteración de larga duración/permanente en la modulación serotoninérgica causado en respuesta a la alteración de los niveles de 5-HT a los que ésta expuesto el feto durante la gestación, tal y como lo postulan diversos trabajos (Blažević *et al.*, 2010; Côté *et al.*, 2007; Hranilovic *et al.*, 2011; Whitaker-Azmitia, 2001).

Dado que los principales receptores serotoninérgicos encontrados en neuronas piramidales de la capa V-VI de CPF son el receptor 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A</sub> (Burnet *et al.*, 1995; Leiser *et al.*, 2015; Santana & Artigas, 2017) nos enfocamos en ellos al diseccionar la modulación serotoninérgica de la  $I_{\text{NMDA}}$ . El primer receptor que estudiamos fue el receptor 5-HT<sub>1A</sub>, cuya modulación tuvo diferencias significativas entre los grupos, en

particular, encontramos un aumento del efecto inhibitorio de la  $I_{NMDA}$  mediado por este receptor, lo cual alude a un aumento en de la expresión y/o la sensibilidad del receptor en respuesta al tratamiento. No obstante, Lauder (2000) encontró una disminución de la expresión del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en cerebro completo, al aplicar un tratamiento similar al utilizado en el presente trabajo. Esta diferencia, probablemente se deba a que la investigación antes citadas cuantificó la densidad del receptor en el PND4 y la medición de las corrientes presentadas en nuestro trabajo son registradas entre los días PND40 y PND60. Postulamos que la diferencia se deba principalmente a la diferencia de tiempo con base el trabajo de Maden (Madden & Zup, 2014) en el cual se denota una diferencia en la expresión del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en el núcleo paraventricular del tálamo en distintas fechas posteriores a un tratamiento con 5-MT desde el GD12 hasta las distintas fechas en que se realizó el sacrificio, encontrando un cambio a la baja en PND10 el cual se torna en un cambio con tendencia al alza alrededor del PND18. De este modo el trabajo de Maden denota la existencia de cambios a través del tiempo en la respuesta adaptativa a la hiperserotoninemia durante la gestación.

Aunado a lo anterior, cabe recordar que el receptor 5-HT<sub>1A</sub> puede expresarse como heteroreceptor (postsináptico en células no serotoninérgicas) o autoreceptor (presináptico en células serotoninérgicas), y que ambos cuentan con una regulación distinta (Albert, 2012; Albert & Vahid-Ansari, 2019; la Cour *et al.*, 2006), así como papeles distintos durante el desarrollo (Altieri *et al.*, 2013; Richardson-Jones *et al.*, 2010, 2011) y la modulación serotoninérgica (Albert & Vahid-Ansari, 2019; Altieri *et al.*, 2013; Garcia-Garcia *et al.*, 2014). Un claro ejemplo de lo anterior es la desensibilización y regulación hacia abajo que presenta la subpoblación presináptica ante la estimulación constante, mientras que la población postsináptica es resistente a éste fenómeno (Bouaziz *et al.*, 2014; Giovacchini *et al.*, 2005; Mochizuki *et al.*, 2002).

Es importante tener en cuenta estos factores y diferencias entre subpoblaciones para entender el proceso adaptativo el cual probablemente se está presentando bajo el tratamiento con 5-MT durante la gestación. Ya que, como en secciones previas fue mencionado, durante la gestación el sistema serotoninérgico ejerce un papel autoregulatorio de su crecimiento, el cual es dado a través de una retroalimentación negativa principalmente mediado por el autoreceptor 5-HT<sub>1A</sub> (Albert *et al.*, 2011; Shemer *et al.*, 1991; Whitaker-Azmitia & Azmitia, 1986). Por tanto, la activación constante de éste receptor causada por altas concentraciones de 5-HT o el agonista utilizado para emular dicha alta concentración, probablemente pueda causar una desensibilización o regulación hacia debajo de la subpoblación presináptica del receptor, causando un aumento aun mayor de la concentración de 5-HT que desemboca, entre otras

cosas, en una pérdida de terminales serotoninérgicas como lo ha postulado Whitaker-Azmitia para el modelo DHS (2005).

Un ejemplo particular de la adaptación resultante a la disminución de la función autoreceptora del receptor 5-HT<sub>1A</sub> el cual tiene un particular interés para esta tesis, es el modelo en ratones *knockout* de Pet-1, factor el cual promueve la expresión del receptor 5-HT<sub>1A</sub> presináptico (autoreceptor). Éste modelo, además de altas concentraciones de 5-HT extracelular (Richardson-Jones *et al.*, 2011), disminución de inervaciones serotoninérgicas en diversas áreas del cerebro (Kiyasova *et al.*, 2011) y conductas de tipo ansiedad (Liu *et al.*, 2017; Richardson-Jones *et al.*, 2010), de manera interesante, presenta también hipersensibilización y regulación hacia arriba del receptor 5-HT<sub>1A</sub> postsináptico tanto en hipocampo, como en la CPF (Yadav *et al.*, 2011)

Con base en lo anteriormente descrito, postulamos que la administración de 5-MT (sc. 1mg/kg/day) desde el GD11 hasta el GD21 puede estar causando una desensibilización y/o regulación hacia abajo de la subpoblación del receptor 5-HT<sub>1A</sub> presináptica durante el periodo gestacional. De igual modo, postulamos que esta regulación hacia abajo, produce un cambio adaptativo de larga duración o permanente el cual se da de manera paulatina conforme madura el sistema serotoninérgico. Además, este cambio adaptativo sería el que derive finalmente, entre otras cosas, en un aumento de la sensibilidad y/o expresión del receptor 5-HT<sub>1A</sub> postsináptico y por ende en la alteración de la modulación serotoninérgica mediada por éste receptor de la I<sub>Glut</sub> y en particular de la I<sub>NMDA</sub>. No obstante, para confirmar este modelo aún se requiere confirmar la regulación al alza y a la baja de las subpoblaciones pre y postsinápticas del receptor 5-HT<sub>1A</sub> respectivamente.

Por otro lado, a pesar de no haberse encontrado diferencias significativas en la modulación de la I<sub>NMDA</sub> mediada por el receptor 5-HT<sub>2A</sub>, es preciso mencionar que se encontró, en primer lugar, que éste receptor era capaz de modular directamente la I<sub>NMDA</sub>, y en segundo lugar, que ésta modulación es inhibitoria. Ambos hallazgos son de sumo interés ya que difieren de lo encontrado por Yuen y colaboradores (2008) quienes en de igual modo en célula agudamente disociada reportan que la activación por si misma del receptor 5-HT<sub>2A/C</sub> no afecta directamente la I<sub>NMDA</sub> de neuronas piramidales de la CPF, sino que se contrapone a la modulación mediada por el receptor 5-HT<sub>1A</sub>.

En el mismo trabajo de Yuen y colaboradores (2008), ellos mencionan que sus resultados difieren de los hallazgos previamente expuestos por Arvanov (Arvanov, Liang, Magro, *et al.*, 1999; Arvanov, Liang, Russo, *et al.*, 1999) y que tal discrepancia probablemente es debida a diferencias metodológicas, ya que Arvanov

realiza su registro en una preparación de rebana y el goteo con que aplica el NMDA es demasiado lento para una adecuada detección del pico de la corriente.

No obstante, al hecho de que la preparación utilizada durante el presente trabajo es la misma que la utilizada por el equipo de Yuen y a que por tanto dista de igual manera con el trabajo de Arvanov, los resultados que aquí presentamos se acoplan de mejor manera a lo expuesto por este último. Por tanto, argüimos que las discrepancias entre los trabajos de Yuen y Arvanov, no se deben a lo previamente expuesto, si no al fármaco utilizado por cada uno de los equipos para activar al receptor 5-HT<sub>2A</sub>. Por su parte, Yuen hace uso del derivado de la triptamina  $\alpha$ -metil-serotonina ( $\alpha$ -Me-5-HT), mientras que Arvanov, durante sus experimentos utiliza principalmente 1-2,5-dimethoxy-4-bromophenol-2-aminopropane (DOB), alucinógeno de la familia de las feniletilaminas, misma familia a la que pertenece DOI, fármaco utilizado en los experimentos del presente trabajo.

La conclusión expuesta anteriormente, la basamos principalmente en el hecho de que Schmid en 2008 mostro evidencia clara de que distintos fármacos con acción en el receptor 5-HT<sub>2A</sub> son capaces de activar distintas vías de señalización dependiendo solamente de las diferencias estructurales del fármaco mismo. No obstante, esta hipótesis requiere una mayor profundización en el tema.

Como último tema, cabe resaltar que los resultados de la presente investigación cobran mayor relevancia bajo el hecho de que la mayor parte de las investigaciones realizadas que analizan los cambios adaptativos posteriores a un incremento de la concentración de 5-HT durante el desarrollo, se han enfocado en los cambios conductuales (Kahne *et al.*, 2002; Madden & Zup, 2014; Martin *et al.*, 2012; McNamara *et al.*, 2008) y morfológicos (Janušonis *et al.*, 2006; Shemer *et al.*, 1991; Whitaker-Azmitia & Azmitia, 1986), no obstante, son muy pocos los que han abordado los cambios electrofisiológicos (Rebello *et al.*, 2014).

Aunado a lo anterior, cabe recordar que el modelo DHS fue concebido por Whitaker-Azmitia como un modelo de autismo (Whitaker-Azmitia, 2005) el cual se basa en la teoría de que dicho trastorno es el resultado de un incremento de la concentración de 5-HT a la que se encuentra expuesto el feto durante el desarrollo. No obstante, ésta teoría se encuentra basada principalmente en evidencia morfológica y conductual (Kahne *et al.*, 2002; McNamara *et al.*, 2008; Whitaker-Azmitia, 2005) sin ahondar en las alteraciones funcionales subyacentes. Por tanto, nuestro estudio, el cual examina los cambios en las corrientes iónicas y en su modulación proveen información que puede ser de importancia para un entendimiento más profundo de los cambios presentes en el trastorno Autista. Además, al enfocarse nuestro estudio en un periodo de tiempo particular de la gestación, aporta información que permita

encontrar en futuros estudios la ventana de tiempo crítica en la cual subyacen los cambios involucrados en este trastorno.

Por otra parte, es de interés el comentar la existencia de otra teoría la cual postula que el autismo podría ser producto de un desorden hipoglutamatérgico (Carlsson, 1998). Esta teoría se basa en estudios neuroanatómicos y de neuroimagen los cuales indican alteraciones en regiones ricas en neuronas glutamatérgicas, así como la observación de síntomas similares entre pacientes autistas y aquellos producidos por el antagonismo de los receptores a glutamato tipo NMDA en pacientes sanos. Además, en apoyo a ésta teoría, en algunos pacientes tanto con autismo como con esquizofrenia se han encontrado recientemente variaciones en el gen que codifica la subunidad GluN2B que no permiten su adecuado tráfico y expresión en la superficie celular (Liu *et al.*, 2017; Sceniak *et al.*, 2019). Al respecto, cabe recordar que de acuerdo a lo demostrado por Yuen y colaboradores (2005), la activación del receptor 5-HT<sub>1A</sub> disminuye el tráfico y expresión de la subunidad Glu2B. Por tanto, un incremento en la función del receptor 5-HT<sub>1A</sub> como la encontrada en el presente trabajo, podría exacerbar dicho mecanismo mediado por el receptor 5-HT<sub>1A</sub>, contribuyendo así al desarrollo de un trastorno autista u otros desordenes.

Finalmente, no debemos olvidar que el sistema serotoninérgico interactúa con una gran variedad de otros sistemas de neurotransmisión y neuromodulación (Charnay & Léger, 2010; Niederkofler *et al.*, 2015; Seyedabadi *et al.*, 2014), incluso en ocasiones pudiendo modular su liberación (Ciranna, 2006; Fink & Göthert, 2007). Por tanto, una alteración de la correcta función serotoninérgica puede derivar en cambios en la concentración de otros neurotransmisores como la acetilcolina o la dopamina, los cuales han sido asociados con el desarrollo de trastornos como la depresión o la esquizofrenia (Field *et al.*, 2008; Freedman & Ross, 2015; Laplante *et al.*, 2005; McCarthy *et al.*, 2007; Money & Stanwood, 2013), mismos que han sido relacionados también con alteraciones tempranas del sistema serotoninérgico en múltiples ocasiones (Albert *et al.*, 2014; Fukuda, 2014; Holloway *et al.*, 2013; Jacobsen *et al.*, 2012; Nautiyal & Hen, 2017). Es por tanto de vital importancia estudiar los cambios adaptativos y la interacción entre distintos sistemas de neurotransmisión y neuromodulación. En este sentido nuestro estudio aporta un primer estudio de la modulación de corrientes iónicas posterior a una variación en la concentración de un neuromodulador al cual se ve expuesto el cerebro del feto durante el periodo gestacional.

## 8 CONCLUSIONES

---

La administración a madres gestantes de 5-MT (sc. 1mg/kg/day) en el periodo GD11 a GD21 afecta en presencia de 5-HT al componente de la  $I_{\text{Glut}}$  dependiente de los receptores de tipo NMDA en neuronas piramidales agudamente disociadas de las capas V-VI de corteza prefrontal de las crías.

Los cambios observados tanto a nivel de la amplitud del pico, como en el EE de la  $I_{\text{NMDA}}$  en presencia de 5-HT no corresponden a una alteración de la corriente por sí misma, sino a una alteración de la modulación que la 5-HT ejerce sobre ella.

El tratamiento con 5-MT durante la gestación produce un incremento significativo del efecto modulador ejercido por la 5-HT tanto a nivel de la amplitud del pico como del EE de la  $I_{\text{NMDA}}$ .

Los cambios en la modulación serotoninérgica de la  $I_{\text{NMDA}}$  se deben a una alteración al alza en la sensibilidad y/o la expresión del receptor 5-HT<sub>1A</sub>, mientras que el receptor 5-HT<sub>2A</sub> no se encuentra afectado por el tratamiento aplicado.

**La administración materna del agonista serotoninérgico 5-Metoxitriptamina durante el desarrollo de las crías, produce un incremento del efecto inhibitor de la serotonina sobre las corrientes de glutamato de tipo NMDA en neuronas piramidales de la capa V-VI de la corteza prefrontal de rata, el cual es debido a un aumento en la expresión y/o sensibilidad del receptor 5-HT<sub>1A</sub>.**

## 9 BIBLIOGRAFÍA

- 
- Aghajanian, G. K., & Marek, G. J. (2000). Serotonin model of schizophrenia: emerging role of glutamate mechanisms. *Brain Research. Brain Research Reviews*, *31*(2–3), 302–312.
- Ährlund-Richter, S., Xuan, Y., van Lunteren, J. A., Kim, H., Ortiz, C., Pollak Dorocic, I., Meletis, K., & Carlén, M. (2019). A whole-brain atlas of monosynaptic input targeting four different cell types in the medial prefrontal cortex of the mouse. *Nature Neuroscience*, *22*(4), 657–668. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0354-y>
- Albert, P. R. (2012). Transcriptional regulation of the 5-HT1A receptor: implications for mental illness. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *367*(1601), 2402–2415. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0376>
- Albert, P. R., Le François, B., & Millar, A. M. (2011). Transcriptional dysregulation of 5-HT1A autoreceptors in mental illness. *Molecular Brain*, *4*(1), 21. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-4-21>
- Albert, P. R., & Vahid-Ansari, F. (2019). The 5-HT1A receptor: Signaling to behavior. *Biochimie*, *161*, 34–45. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.10.015>
- Albert, P. R., Vahid-Ansari, F., & Luckhart, C. (2014). Serotonin-prefrontal cortical circuitry in anxiety and depression phenotypes: pivotal role of pre- and post-synaptic 5-HT1A receptor expression. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *8*, 199. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00199>
- Altieri, S. C., Garcia-Garcia, A. L., Leonardo, E. D., & Andrews, A. M. (2013). Rethinking 5-HT1A receptors: emerging modes of inhibitory feedback of relevance to emotion-related behavior. *ACS Chemical Neuroscience*, *4*(1), 72–83. <https://doi.org/10.1021/cn3002174>

- Amargós-Bosch, M., Bortolozzi, A., Puig, M. V., Serrats, J., Adell, A., Celada, P., Toth, M., Mengod, G., & Artigas, F. (2004). Co-expression and in vivo interaction of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal neurons of prefrontal cortex. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, *14*(3), 281–299.
- Anderson, G. M., Freedman, D. X., Cohen, D. J., Volkmar, F. R., Hoder, E. L., McPhedran, P., Minderaa, R. B., Hansen, C. R., & Young, J. G. (1987). Whole blood serotonin in autistic and normal subjects. *Journal of Child Psychology and Psychiatry, and Allied Disciplines*, *28*(6), 885–900.
- Anderson, S. W., Bechara, A., Damasio, H., Tranel, D., & Damasio, A. R. (1999). Impairment of social and moral behavior related to early damage in human prefrontal cortex. *Nature Neuroscience*, *2*(11), 1032–1037. <https://doi.org/10.1038/14833>
- Andrade, R. (2011). Serotonergic regulation of neuronal excitability in the prefrontal cortex. *Neuropharmacology*, *61*(3), 382–386. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.01.015>
- Ansorge, M. S., Morelli, E., & Gingrich, J. A. (2008). Inhibition of serotonin but not norepinephrine transport during development produces delayed, persistent perturbations of emotional behaviors in mice. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *28*(1), 199–207. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3973-07.2008>
- Arnsten, A. F. T. (2009). Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. *Nature Reviews. Neuroscience*, *10*(6), 410–422. <https://doi.org/10.1038/nrn2648>
- Arvanov, V. L., Liang, X., Magro, P., Roberts, R., & Wang, R. Y. (1999). A pre- and postsynaptic modulatory action of 5-HT and the 5-HT<sub>2A</sub>, 2C receptor agonist DOB on NMDA-evoked

- responses in the rat medial prefrontal cortex. *European Journal of Neuroscience*, *11*(8), 2917–2934. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00708.x>
- Arvanov, V. L., Liang, X., Russo, A., & Wang, R. Y. (1999). LSD and DOB: interaction with 5-HT<sub>2A</sub> receptors to inhibit NMDA receptor-mediated transmission in the rat prefrontal cortex. *European Journal of Neuroscience*, *11*(9), 3064–3072. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00726.x>
- Ashby, M. C., Daw, M. I., & Isaac, J. T. R. (2008). AMPA Receptors. En R. W. Gereau & G. T. Swanson (Eds.), *The Glutamate Receptors* (pp. 1–44). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-055-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-055-3_1)
- Azmitia, E. C. (2001). Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Research Bulletin*, *56*(5), 413–424.
- Azmitia, E. C., Gannon, P. J., Kheck, N. M., & Whitaker-Azmitia, P. M. (1996). Cellular localization of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor in primate brain neurons and glial cells. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *14*(1), 35–46. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(96\)80057-1](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(96)80057-1)
- Baker, A., Kalmbach, B., Morishima, M., Kim, J., Juavinett, A., Li, N., & Dembrow, N. (2018). Specialized Subpopulations of Deep-Layer Pyramidal Neurons in the Neocortex: Bridging Cellular Properties to Functional Consequences. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0150-18.2018>
- Barbas, H. (2015). General Cortical and Special Prefrontal Connections: Principles from Structure to Function. *Annual Review of Neuroscience*, *38*(1), 269–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071714-033936>

- Barbas, H., & Zikopoulos, B. (2007). The prefrontal cortex and flexible behavior. *The Neuroscientist*, *13*(5), 532–545. <https://doi.org/10.1177/1073858407301369>
- Bargas, J., Howe, A., Eberwine, J., Cao, Y., & Surmeier, D. J. (1994). Cellular and molecular characterization of Ca<sup>2+</sup> currents in acutely isolated, adult rat neostriatal neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *14*(11 Pt 1), 6667–6686.
- Barnes, N. M., & Sharp, T. (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*, *38*(8), 1083–1152.
- Ben-Ari, Y. (2013). Neuropaediatric and neuroarchaeology: understanding development to correct brain disorders. *Acta Paediatrica*, *102*(4), 331–334. <https://doi.org/10.1111/apa.12161>
- Bettler, B., Collingridge, G. L., Dingledine, R., Heinemann, S. F., Hollmann, M., Lerma, J., Lodge, D., Mayer, M., Mishina, M., Mulle, C., Nakanishi, S., Olsen, R., Peineau, S., Peters, J. A., Seeburg, P., Spedding, M., & Watkins, J. C. (2019). Ionotropic glutamate receptors (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. *IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE*, *2019*(4), Article 4. <https://doi.org/10.2218/gtopdb/F75/2019.4>
- Blažević, S., & Hranilović, D. (2013). Expression of 5HT-related genes after perinatal treatment with 5HT agonists. *Translational Neuroscience*, *4*(2), 165–171. <https://doi.org/10.2478/s13380-013-0124-3>
- Blažević, S., Jurčić, Ž., & Hranilović, D. (2010). Perinatal treatment of rats with MAO inhibitor tranylecypromine. *Translational Neuroscience*, *1*(1), 49–54. <https://doi.org/10.2478/v10134-010-0006-y>

- Bloem, B., Poorthuis, R. B., & Mansvelder, H. D. (2014). Cholinergic modulation of the medial prefrontal cortex: the role of nicotinic receptors in attention and regulation of neuronal activity. *Frontiers in Neural Circuits*, 8, 17. <https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00017>
- Bonnin, A., Goeden, N., Chen, K., Wilson, M. L., King, J., Shih, J. C., Blakely, R. D., Deneris, E. S., & Levitt, P. (2011). A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain. *Nature*, 472(7343), 347–350. <https://doi.org/10.1038/nature09972>
- Booij, L., Tremblay, R. E., Szyf, M., & Benkelfat, C. (2015). Genetic and early environmental influences on the serotonin system: consequences for brain development and risk for psychopathology. *Journal of Psychiatry & Neuroscience: JPN*, 40(1), 5–18.
- Bouaziz, E., Emerit, M. B., Vodjdani, G., Gautheron, V., Hamon, M., Darmon, M., & Masson, J. (2014). Neuronal Phenotype Dependency of Agonist-Induced Internalization of the 5-HT<sub>1A</sub> Serotonin Receptor. *Journal of Neuroscience*, 34(1), 282–294. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0186-13.2014>
- Brailowsky, S. (1995). *Las sustancias de los sueños: neuropsicofarmacología*. Fondo De Cultura Economica USA.
- Brodmann, K. (2006). *Brodmann's: Localisation in the Cerebral Cortex [Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde]* (L. Garey J., Trad.). Springer US. <https://doi.org/10.1007/b138298> (Original work published 1909)
- Broman, J., Hassel, B., Rinvik, E., & Ottersen, O. P. (2000). Chapter 1 Biochemistry and anatomy of transmitter glutamate. En O. P. Ottersen & J. Storm-Mathisen (Eds.), *Handbook of Chemical Neuroanatomy* (Vol. 18, pp. 1–44). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0924-8196\(00\)80042-1](https://doi.org/10.1016/S0924-8196(00)80042-1)

- Brumback, A. C., Ellwood, I. T., Kjaerby, C., Iafrati, J., Robinson, S., Lee, A. T., Patel, T., Nagaraj, S., Davatolhagh, F., & Sohal, V. S. (2018). Identifying specific prefrontal neurons that contribute to autism-associated abnormalities in physiology and social behavior. *Molecular Psychiatry*, 23(10), 2078–2089. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.213>
- Brummelte, S., Mc Glanaghy, E., Bonnin, A., & Oberlander, T. F. (2017). Developmental changes in serotonin signaling: Implications for early brain function, behavior and adaptation. *Neuroscience*, 342, 212–231. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.02.037>
- Brunton, L. L., Lazo, J. S., & Parker, K. L. (Eds.). (2007). *Goodman & Gilman: Las bases Farmacológicas de la Terapéutica* (11<sup>a</sup>. edition). McGraw-Hill Interamericana Editores S.A. de C.V.
- Burnet, P. W. J., Eastwood, S. L., Lacey, K., & Harrison, P. J. (1995). The distribution of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptor mRNA in human brain. *Brain Research*, 676(1), 157–168. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00104-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00104-X)
- Burnham, K. P., & Anderson, D. R. (2002). *Model Selection and Multimodel Inference: A Practical Information-Theoretic Approach* (2nd edition). Springer.
- Buznikov, G. A., Lambert, W. H., & Lauder, J. M. (2001). Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis. *Cell and Tissue Research*, 305(2), 177–186. <https://doi.org/10.1007/s004410100408>
- Cai, X., Gu, Z., Zhong, P., Ren, Y., & Yan, Z. (2002). Serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptors regulate AMPA receptor channels through inhibiting Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II in prefrontal cortical pyramidal neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(39), 36553–36562. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203752200>

- Carey, R. J. (2010). CHAPTER 3.2 - Serotonin and Basal Sensory–Motor Control. En C. P. M. and B. L. Jacobs (Ed.), *Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol. 21, pp. 325–330). Elsevier. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1569733910700874>
- Carlén, M. (2017). What constitutes the prefrontal cortex? *Science*, 358(6362), 478–482. <https://doi.org/10.1126/science.aan8868>
- Carlsson, M. L. (1998). Hypothesis: Is infantile autism a hypoglutamatergic disorder? Relevance of glutamate – serotonin interactions for pharmacotherapy. *Journal of Neural Transmission*, 105(4), 525–535. <https://doi.org/10.1007/s007020050076>
- Cases, O., Vitalis, T., Seif, I., Maeyer, E. D., Sotelo, C., & Gaspar, P. (1996). Lack of Barrels in the Somatosensory Cortex of Monoamine Oxidase A–Deficient Mice: Role of a Serotonin Excess during the Critical Period. *Neuron*, 16(2), 297–307. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80048-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80048-3)
- Caspi, A., McClay, J., Moffitt, T. E., Mill, J., Martin, J., Craig, I. W., Taylor, A., & Poulton, R. (2002). Role of genotype in the cycle of violence in maltreated children. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5582), 851–854. <https://doi.org/10.1126/science.1072290>
- Caspi, A., Sugden, K., Moffitt, T. E., Taylor, A., Craig, I. W., Harrington, H., McClay, J., Mill, J., Martin, J., Braithwaite, A., & Poulton, R. (2003). Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science (New York, N.Y.)*, 301(5631), 386–389. <https://doi.org/10.1126/science.1083968>
- Cassel, J.-C. (2010). Experimental Studies on the Role(s) of Serotonin in Learning and Memory Functions. En C. P. Müller & B. L. Jacobs (Eds.), *Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol. 21, pp. 429–447). Elsevier. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1569733910700941>

- Catts, V. S., Fung, S. J., Long, L. E., Joshi, D., Vercammen, A., Allen, K. M., Fillman, S. G., Moore, L., Rothmond, D., Sinclair, D., Tiwari, Y., Tsai, S.-Y., Weickert, T. W., & Shannon Weickert, C. (2013). Rethinking schizophrenia in the context of normal neurodevelopment. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00060>
- Celada, P., Puig, M. V., & Artigas, F. (2013). Serotonin modulation of cortical neurons and networks. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 7. <https://doi.org/10.3389/fnint.2013.00025>
- Charnay, Y., & Léger, L. (2010). Brain serotonergic circuitries. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 12(4), 471–487.
- Chen, P. E., Geballe, M. T., Katz, E., Erreger, K., Livesey, M. R., O'Toole, K. K., Le, P., Lee, C. J., Snyder, J. P., Traynelis, S. F., & Wyllie, D. J. A. (2008). Modulation of glycine potency in rat recombinant NMDA receptors containing chimeric NR2A/2D subunits expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *The Journal of Physiology*, 586(1), 227–245. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.143172>
- Ciranna, L. (2006). Serotonin as a modulator of glutamate- and GABA-mediated neurotransmission: implications in physiological functions and in pathology. *Current Neuropharmacology*, 4(2), 101–114. <https://doi.org/10.2174/157015906776359540>
- Clark, L., Cools, R., & Robbins, T. W. (2004). The neuropsychology of ventral prefrontal cortex: decision-making and reversal learning. *Brain and Cognition*, 55(1), 41–53. [https://doi.org/10.1016/S0278-2626\(03\)00284-7](https://doi.org/10.1016/S0278-2626(03)00284-7)
- Clarke, H. F., Dalley, J. W., Crofts, H. S., Robbins, T. W., & Roberts, A. C. (2004). Cognitive inflexibility after prefrontal serotonin depletion. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5672), 878–880. <https://doi.org/10.1126/science.1094987>

- Clarke, H. F., Walker, S. C., Crofts, H. S., Dalley, J. W., Robbins, T. W., & Roberts, A. C. (2005). Prefrontal serotonin depletion affects reversal learning but not attentional set shifting. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *25*(2), 532–538. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3690-04.2005>
- Clarke, H. F., Walker, S. C., Dalley, J. W., Robbins, T. W., & Roberts, A. C. (2007). Cognitive inflexibility after prefrontal serotonin depletion is behaviorally and neurochemically specific. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, *17*(1), 18–27. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhj120>
- Clarke, R. J., & Johnson, J. W. (2006). NMDA Receptor NR2 Subunit Dependence of the Slow Component of Magnesium Unblock. *Journal of Neuroscience*, *26*(21), 5825–5834. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0577-06.2006>
- Contractor, A., & Swanson, G. T. (2008). Kainate Receptors. En R. W. Gereau & G. T. Swanson (Eds.), *The Glutamate Receptors* (pp. 99–158). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-055-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-055-3_3)
- Cornea-Hébert, V., Riad, M., Wu, C., Singh, S. K., & Descarries, L. (1999). Cellular and subcellular distribution of the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor in the central nervous system of adult rat. *The Journal of Comparative Neurology*, *409*(2), 187–209.
- Côté, F., Fligny, C., Bayard, E., Launay, J.-M., Gershon, M. D., Mallet, J., & Vodjdani, G. (2007). Maternal serotonin is crucial for murine embryonic development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(1), 329–334. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606722104>

- Cotter, D., Hudson, L., & Landau, S. (2005). Evidence for orbitofrontal pathology in bipolar disorder and major depression, but not in schizophrenia. *Bipolar Disorders*, 7(4), 358–369. <https://doi.org/10.1111/j.1399-5618.2005.00230.x>
- Crockett, M. J., Clark, L., Hauser, M. D., & Robbins, T. W. (2010). Serotonin selectively influences moral judgment and behavior through effects on harm aversion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(40), 17433–17438. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009396107>
- Cull-Candy, S., Brickley, S., & Farrant, M. (2001). NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Current Opinion in Neurobiology*, 11(3), 327–335. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00215-4](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00215-4)
- Cunha, R. A., Malva, J. O., & Ribeiro, J. A. (1999). Kainate Receptors Coupled to Gi/GoProteins in the Rat Hippocampus. *Molecular Pharmacology*, 56(2), 429–433. <https://doi.org/10.1124/mol.56.2.429>
- Dalley, J. W., Cardinal, R. N., & Robbins, T. W. (2004). Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28(7), 771–784. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.09.006>
- Dalley, J. W., Theobald, D. E., Eagle, D. M., Passetti, F., & Robbins, T. W. (2002). Deficits in impulse control associated with tonically-elevated serotonergic function in rat prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 26(6), 716–728. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(01\)00412-2](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(01)00412-2)

- Dash, P. K., Moore, A. N., Kobori, N., & Runyan, J. D. (2007). Molecular activity underlying working memory. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, *14*(8), 554–563. <https://doi.org/10.1101/lm.558707>
- Daubert, E. A., & Condrón, B. G. (2010). Serotonin: a regulator of neuronal morphology and circuitry. *Trends in Neurosciences*, *33*(9), 424–434. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.05.005>
- Davidson, R. J. (2016). The neural circuitry of emotion and affective style: prefrontal cortex and amygdala contributions: *Social Science Information*. <https://doi.org/10.1177/053901801040001002>
- de Bruin, J. P., Corner, M. A., Feenstra, M. G. P., Eden, C. G. V., & Uylings, H. B. M. (1991). *The Prefrontal Cortex: Its Structure, Function and Pathology: Its Structure, Function and Pathology*. Elsevier.
- De Rubeis, S., He, X., Goldberg, A. P., Poultney, C. S., Samocha, K., Cicek, A. E., Kou, Y., Liu, L., Fromer, M., Walker, S., Singh, T., Klei, L., Kosmicki, J., Shih-Chen, F., Aleksic, B., Biscaldi, M., Bolton, P. F., Brownfeld, J. M., Cai, J., ... Buxbaum, J. D. (2014). Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature*, *515*(7526), 209–215. <https://doi.org/10.1038/nature13772>
- DeFelipe, J., Arellano, J. I., Gómez, A., Azmitia, E. C., & Muñoz, A. (2001). Pyramidal cell axons show a local specialization for GABA and 5-HT inputs in monkey and human cerebral cortex. *The Journal of Comparative Neurology*, *433*(1), 148–155.
- DeFelipe, J., & Fariñas, I. (1992). The pyramidal neuron of the cerebral cortex: Morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Progress in Neurobiology*, *39*(6), 563–607. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(92\)90015-7](https://doi.org/10.1016/0301-0082(92)90015-7)

- DeFelipe, J., Markram, H., & Rockland, K. S. (2012). The Neocortical Column. *Frontiers in Neuroanatomy*, 6. <https://doi.org/10.3389/fnana.2012.00022>
- Delatour, B., & Gisquet-Verrier, P. (2000). Functional role of rat prelimbic-infralimbic cortices in spatial memory: evidence for their involvement in attention and behavioural flexibility. *Behavioural Brain Research*, 109(1), 113–128. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(99\)00168-0](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(99)00168-0)
- Dembrow, N., & Johnston, D. (2014). Subcircuit-specific neuromodulation in the prefrontal cortex. *Frontiers in Neural Circuits*, 8, 54. <https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00054>
- Deserno, L., Sterzer, P., Wüstenberg, T., Heinz, A., & Schlagenhauf, F. (2012). Reduced Prefrontal-Parietal Effective Connectivity and Working Memory Deficits in Schizophrenia. *Journal of Neuroscience*, 32(1), 12–20. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3405-11.2012>
- Dixon, M. L., Thiruchselvam, R., Todd, R., & Christoff, K. (2017). Emotion and the prefrontal cortex: An integrative review. *Psychological Bulletin*, 143(10), 1033–1081. <https://doi.org/10.1037/bul0000096>
- Dooley, A. E., Pappas, I. S., & Parnavelas, J. G. (1997). Serotonin Promotes the Survival of Cortical Glutamatergic Neurons in Vitro. *Experimental Neurology*, 148(1), 205–214. <https://doi.org/10.1006/exnr.1997.6633>
- Drevets, W. C. (2000). Neuroimaging studies of mood disorders. *Biological Psychiatry*, 48(8), 813–829. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(00\)01020-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(00)01020-9)
- Duman, E. A., & Canli, T. (2010). Social Behavior and Serotonin. In C. P. M. and B. L. Jacobs (Ed.), *Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol. 21, pp. 449–456). Elsevier. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1569733910700953>

- Eggers, A. E. (2013). A serotonin hypothesis of schizophrenia. *Medical Hypotheses*, 80(6), 791–794. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2013.03.013>
- Euston, D. R., Gruber, A. J., & McNaughton, B. L. (2012). The Role of Medial Prefrontal Cortex in Memory and Decision Making. *Neuron*, 76(6), 1057–1070. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.002>
- Field, T., Diego, M., Hernandez-Reif, M., Figueiredo, B., Deeds, O., Ascencio, A., Schanberg, S., & Kuhn, C. (2008). Prenatal dopamine and neonatal behavior and biochemistry. *Infant Behavior and Development*, 31(4), 590–593. <https://doi.org/10.1016/j.infbeh.2008.07.007>
- Fink, K. B., & Göthert, M. (2007). 5-HT Receptor Regulation of Neurotransmitter Release. *Pharmacological Reviews*, 59(4), 360–417. <https://doi.org/10.1124/pr.59.07103>
- Fiske, A., & Holmboe, K. (2019). Neural substrates of early executive function development. *Developmental Review*, 52, 42–62. <https://doi.org/10.1016/j.dr.2019.100866>
- Flores-Hernández, J., Cepeda, C., Hernández-Echeagaray, E., Calvert, C. R., Jokel, E. S., Fienberg, A. A., Greengard, P., & Levine, M. S. (2002). Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized striatal neurons: role of D1 receptors and DARPP-32. *Journal of Neurophysiology*, 88(6), 3010–3020. <https://doi.org/10.1152/jn.00361.2002>
- Flores-Hernández, J., Hernandez, S., Snyder, G. L., Yan, Z., Fienberg, A. A., Moss, S. J., Greengard, P., & Surmeier, D. J. (2000). D(1) dopamine receptor activation reduces GABA(A) receptor currents in neostriatal neurons through a PKA/DARPP-32/PP1 signaling cascade. *Journal of Neurophysiology*, 83(5), 2996–3004.
- Folstein, S., & Rutter, M. (1977). Infantile autism: a genetic study of 21 twin pairs. *Journal of Child Psychology and Psychiatry, and Allied Disciplines*, 18(4), 297–321.

- Frederick, A. L., & Stanwood, G. D. (2009). Drugs, Biogenic Amine Targets and the Developing Brain. *Developmental Neuroscience*, *31*(1–2), 7–22. <https://doi.org/10.1159/000207490>
- Freedman, R., & Ross, R. G. (2015). Prenatal choline and the development of schizophrenia. *Shanghai Archives of Psychiatry*, *27*(2), 90–102. <https://doi.org/10.11919/j.issn.1002-0829.215006>
- Fukuda, K. (2014). 5-HTP hypothesis of schizophrenia. *Medical Hypotheses*, *82*(1), 20–23. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2013.10.026>
- Funahashi, S., & Andreau, J. M. (2013). Prefrontal cortex and neural mechanisms of executive function. *Journal of Physiology-Paris*, *107*(6), 471–482. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2013.05.001>
- Fuster, J. M. (2002). Frontal lobe and cognitive development. *Journal of Neurocytology*, *31*(3–5), 373–385.
- Fuster, J. M. (2015). *The Prefrontal Cortex* (5th Edition). Academic Press.
- Gabbott, P. L. A., Dickie, B. G. M., Vaid, R. R., Headlam, A. J. N., & Bacon, S. J. (1997). Local-circuit neurones in the medial prefrontal cortex (areas 25, 32 and 24b) in the rat: Morphology and quantitative distribution. *Journal of Comparative Neurology*, *377*(4), 465–499. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19970127\)377:4<465::AID-CNE1>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19970127)377:4<465::AID-CNE1>3.0.CO;2-0)
- Gabbott, P. L. A., Warner, T. A., Jays, P. R. L., Salway, P., & Busby, S. J. (2005). Prefrontal cortex in the rat: Projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *Journal of Comparative Neurology*, *492*(2), 145–177. <https://doi.org/10.1002/cne.20738>
- Garcia, L. P., Witteveen, J. S., Middelman, A., van Hulten, J. A., Martens, G. J. M., Homberg, J. R., & Kolk, S. M. (2019). Perturbed Developmental Serotonin Signaling Affects Prefrontal

- Catecholaminergic Innervation and Cortical Integrity. *Molecular Neurobiology*, 56(2), 1405–1420. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1105-x>
- García-Alcocer, G., Segura, L. C. B., García Peña, M., Martínez-Torres, A., & Miledi, R. (2006). Ontogenetic distribution of 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>5A</sub>, and 5-HT<sub>7</sub> receptors in the rat hippocampus. *Gene Expression*, 13(1), 53–57.
- García-Cabezas, M. Á., & Zikopoulos, B. (2019). Evolution, development, and organization of the cortical connectome. *PLOS Biology*, 17(5), e3000259. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000259>
- García-García, A. L., Newman-Tancredi, A., & Leonardo, E. D. (2014). 5-HT<sub>1A</sub> receptors in mood and anxiety: recent insights into autoreceptor versus heteroreceptor function. *Psychopharmacology*, 231(4), 623–636. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3389-x>
- Gaspar, P., Cases, O., & Maroteaux, L. (2003). The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nature Reviews. Neuroscience*, 4(12), 1002–1012. <https://doi.org/10.1038/nrn1256>
- Gentet, L. J. (2012). Functional diversity of supragranular GABAergic neurons in the barrel cortex. *Frontiers in Neural Circuits*, 6. <https://doi.org/10.3389/fncir.2012.00052>
- Gentet, L. J., Stuart, G. J., & Clements, J. D. (2000). Direct Measurement of Specific Membrane Capacitance in Neurons. *Biophysical Journal*, 79(1), 314–320. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76293-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76293-X)
- Gereau, R. W., & Swanson, G. (Eds.). (2008). *The Glutamate Receptors*. Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-055-3>

- Ghoshal, A., & Conn, P. J. (2015). The hippocampo-prefrontal pathway: a possible therapeutic target for negative and cognitive symptoms of schizophrenia. *Future Neurology*, *10*(2), 115–128. <https://doi.org/10.2217/fnl.14.63>
- Giovacchini, G., Lang, L., Ma, Y., Herscovitch, P., Eckelman, W. C., & Carson, R. E. (2005). Differential effects of paroxetine on raphe and cortical 5-HT<sub>1A</sub> binding: A PET study in monkeys. *NeuroImage*, *28*(1), 238–248. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2005.05.042>
- Glasgow, N. G., Retchless, B. S., & Johnson, J. W. (2015). Molecular bases of NMDA receptor subtype-dependent properties. *The Journal of Physiology*, *593*(1), 83–95. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.273763>
- Goeden, N., Velasquez, J., Arnold, K. A., Chan, Y., Lund, B. T., Anderson, G. M., & Bonnin, A. (2016). Maternal Inflammation Disrupts Fetal Neurodevelopment via Increased Placental Output of Serotonin to the Fetal Brain. *Journal of Neuroscience*, *36*(22), 6041–6049. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2534-15.2016>
- González-Burgos, I., Angel-Meza, A. R. D., Barajas-López, G., & Feria-Velasco, A. (1996). Tryptophan restriction causes long-term plastic changes in corticofrontal pyramidal neurons. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *14*(5), 673–679. [https://doi.org/10.1016/0736-5748\(96\)00094-9](https://doi.org/10.1016/0736-5748(96)00094-9)
- Gordon, I., Vander Wyk, B. C., Bennett, R. H., Cordeaux, C., Lucas, M. V., Eilbott, J. A., Zagoory-Sharon, O., Leckman, J. F., Feldman, R., & Pelphrey, K. A. (2013). Oxytocin enhances brain function in children with autism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(52), 20953–20958. <https://doi.org/10.1073/pnas.1312857110>

- Goulas, A., Zilles, K., & Hilgetag, C. C. (2018). Cortical Gradients and Laminar Projections in Mammals. *Trends in Neurosciences*, 41(11), 775–788.  
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.06.003>
- Green, J. J., & Hollander, E. (2010). Autism and oxytocin: new developments in translational approaches to therapeutics. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 7(3), 250–257.  
<https://doi.org/10.1016/j.nurt.2010.05.006>
- Green, L., Fein, D., Modahl, C., Feinstein, C., Waterhouse, L., & Morris, M. (2001). Oxytocin and autistic disorder: alterations in peptide forms. *Biological Psychiatry*, 50(8), 609–613.
- Heine, M., Ponimaskin, E., Bickmeyer, U., & Richter, D. W. (2002). 5-HT-receptor-induced changes of the intracellular cAMP level monitored by a hyperpolarization-activated cation channel. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 443(3), 418–426.  
<https://doi.org/10.1007/s004240100690>
- Hensler, J. G. (2010). Serotonin in Mood and Emotion. En C. P. M. and B. L. Jacobs (Ed.), *Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol. 21, pp. 367–378). Elsevier.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1569733910700904>
- Herlenius, E., & Lagercrantz, H. (2004). Development of neurotransmitter systems during critical periods. *Experimental Neurology*, 190, 8–21.  
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.03.027>
- Hevner, R. F. (2006). From radial glia to pyramidal-projection neuron. *Molecular Neurobiology*, 33(1), 33–50. <https://doi.org/10.1385/MN:33:1:033>
- Hollander, E., Novotny, S., Hanratty, M., Yaffe, R., DeCaria, C. M., Aronowitz, B. R., & Mosovich, S. (2003). Oxytocin infusion reduces repetitive behaviors in adults with autistic

- and Asperger's disorders. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 28(1), 193–198.  
<https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300021>
- Hollerman, J. R., Tremblay, L., & Schultz, W. (2000). Involvement of basal ganglia and orbitofrontal cortex in goal-directed behavior. *Progress in Brain Research*, 126, 193–215.  
[https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(00\)26015-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(00)26015-9)
- Holloway, T., Moreno, J. L., Umali, A., Rayannavar, V., Hodes, G. E., Russo, S. J., & González-Maeso, J. (2013). Prenatal Stress Induces Schizophrenia-Like Alterations of Serotonin 2A and Metabotropic Glutamate 2 Receptors in the Adult Offspring: Role of Maternal Immune System. *Journal of Neuroscience*, 33(3), 1088–1098.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2331-12.2013>
- Hornung, J.-P. (2003). The human raphe nuclei and the serotonergic system. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 26(4), 331–343.
- Hornung, J.-P. (2010). CHAPTER 1.3 - The Neuroanatomy of the Serotonergic System. En C. P. M. and B. L. Jacobs (Ed.), *Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol. 21, pp. 51–64). Elsevier. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1569733910700710>
- Hranilovic, D., Blazevic, S., Ivica, N., Cicin-Sain, L., & Oreskovic, D. (2011). The effects of the perinatal treatment with 5-hydroxytryptophan or tranylcypromine on the peripheral and central serotonin homeostasis in adult rats. *Neurochemistry International*, 59(2), 202–207.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.05.003>
- Insel, T. R., & Winslow, J. T. (1998). Serotonin and neuropeptides in affiliative behaviors. *Biological Psychiatry*, 44(3), 207–219.

- Jacobsen, J. P. R., Medvedev, I. O., & Caron, M. G. (2012). The 5-HT deficiency theory of depression: perspectives from a naturalistic 5-HT deficiency model, the tryptophan hydroxylase 2Arg439His knockin mouse. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *367*(1601), 2444–2459. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0109>
- Jakab, R. L., & Goldman-Rakic, P. S. (1998). 5-Hydroxytryptamine<sub>2A</sub> serotonin receptors in the primate cerebral cortex: possible site of action of hallucinogenic and antipsychotic drugs in pyramidal cell apical dendrites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(2), 735–740.
- Janušonis, S., Anderson, G. M., Shifrovich, I., & Rakic, P. (2006). Ontogeny of brain and blood serotonin levels in 5-HT<sub>1A</sub> receptor knockout mice: potential relevance to the neurobiology of autism. *Journal of Neurochemistry*, *99*(3), 1019–1031. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04150.x>
- Janušonis, S., Gluncic, V., & Rakic, P. (2004). Early serotonergic projections to Cajal-Retzius cells: relevance for cortical development. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *24*(7), 1652–1659. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4651-03.2004>
- Jenkins, L. M., Andrewes, D. G., Nicholas, C. L., Drummond, K. J., Moffat, B. A., Phal, P., Desmond, P., & Kessels, R. P. C. (2014). Social cognition in patients following surgery to the prefrontal cortex. *Psychiatry Research*, *224*(3), 192–203. <https://doi.org/10.1016/j.psychresns.2014.08.007>
- Jones, E. G. (2000). Microcolumns in the cerebral cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(10), 5019–5021. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.10.5019>

- Judaš, M., & Ceganec, M. (2010). Oskar Vogt: The first myeloarchitectonic map of the human frontal cortex. *Translational Neuroscience*, *1*(1), 72–94. <https://doi.org/10.2478/v10134-010-0005-z>
- Kahne, D., Tudorica, A., Borella, A., Shapiro, L., Johnstone, F., Huang, W., & Whitaker-Azmitia, P. M. (2002). Behavioral and magnetic resonance spectroscopic studies in the rat hyperserotonemic model of autism. *Physiology & Behavior*, *75*(3), 403–410.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A., & Hudspeth, A. J. (Eds.). (2012). *Principles of Neural Science* (5th edition). McGraw-Hill Professional.
- Kawaguchi, Y. (2017). Pyramidal Cell Subtypes and Their Synaptic Connections in Layer 5 of Rat Frontal Cortex. *Cerebral Cortex*, *27*(12), 5755–5771. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhx252>
- Kesner, R. P. (2000). Subregional analysis of mnemonic functions of the prefrontal cortex in the rat. *Psychobiology*, *28*(2), 219–228. <https://doi.org/10.3758/BF03331980>
- Kiser, D., Steemers, B., Branchi, I., & Homberg, J. R. (2012). The reciprocal interaction between serotonin and social behaviour. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *36*(2), 786–798. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.12.009>
- Kiyasova, V., Fernandez, S. P., Laine, J., Stankovski, L., Muzerelle, A., Doly, S., & Gaspar, P. (2011). A Genetically Defined Morphologically and Functionally Unique Subset of 5-HT Neurons in the Mouse Raphe Nuclei. *Journal of Neuroscience*, *31*(8), 2756–2768. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4080-10.2011>
- Kolb, B. (1974). Social behavior of rats with chronic prefrontal lesions. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *87*(3), 466–474. <https://doi.org/10.1037/h0036969>

- Kolb, B. (1984). Functions of the frontal cortex of the rat: A comparative review. *Brain Research Reviews*, 8(1), 65–98. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(84\)90018-3](https://doi.org/10.1016/0165-0173(84)90018-3)
- Kolb, B. (1991). Chapter 25 Animal models for human PFC-related disorders. En H. B. M. Uylings, C. G. Van Eden, J. P. C. De Bruin, M. A. Corner, & M. G. P. Feenstra (Eds.), *Progress in Brain Research* (Vol. 85, pp. 501–519). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)62697-7](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)62697-7)
- Kuner, T., & Schoepfer, R. (1996). Multiple Structural Elements Determine Subunit Specificity of Mg<sup>2+</sup> Block in NMDA Receptor Channels. *Journal of Neuroscience*, 16(11), 3549–3558. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-11-03549.1996>
- la Cour, C. M., Mestikawy, S. E., Hanoun, N., Hamon, M., & Lanfumey, L. (2006). Regional Differences in the Coupling of 5-Hydroxytryptamine-1A Receptors to G Proteins in the Rat Brain. *Molecular Pharmacology*, 70(3), 1013–1021. <https://doi.org/10.1124/mol.106.022756>
- Lanoir, J., Hilaire, G., & Seif, I. (2006). Reduced density of functional 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the brain, medulla and spinal cord of monoamine oxidase-A knockout mouse neonates. *The Journal of Comparative Neurology*, 495(5), 607–623. <https://doi.org/10.1002/cne.20916>
- Laplante, F., Nakagawasai, O., Srivastava, L. K., & Quirion, R. (2005). Alterations in Behavioral Responses to a Cholinergic Agonist in Post-Pubertal Rats with Neonatal Ventral Hippocampal Lesions: Relationship to Changes in Muscarinic Receptor Levels. *Neuropsychopharmacology*, 30(6), 1076–1087. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300640>
- Lattimore, K. A., Donn, S. M., Kaciroti, N., Kemper, A. R., Neal, C. R., & Vazquez, D. M. (2005). Selective Serotonin Reuptake Inhibitor (SSRI) Use during Pregnancy and Effects on the

- Fetus and Newborn: A Meta-Analysis. *Journal of Perinatology*, 25(9), 595–604.  
<https://doi.org/10.1038/sj.jp.7211352>
- Lauder, J. M. (1990). Ontogeny of the serotonergic system in the rat: serotonin as a developmental signal. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 600, 297–313; discussion 314.
- Lauder, J. M., Liu, J., & Grayson, D. R. (2000). In utero exposure to serotonergic drugs alters neonatal expression of 5-HT(1A) receptor transcripts: a quantitative RT-PCR study. *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 18(2–3), 171–176.
- Lee, M. D., & Clifton, P. G. (2010). CHAPTER 3.3 - Role of the Serotonergic System in Appetite and Ingestion Control. En C. P. M. and B. L. Jacobs (Ed.), *Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol. 21, pp. 331–345). Elsevier.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1569733910700886>
- Leiser, S. C., Li, Y., Pehrson, A. L., Dale, E., Smagin, G., & Sanchez, C. (2015). Serotonergic Regulation of Prefrontal Cortical Circuitries Involved in Cognitive Processing: A Review of Individual 5-HT Receptor Mechanisms and Concerted Effects of 5-HT Receptors Exemplified by the Multimodal Antidepressant Vortioxetine. *ACS Chemical Neuroscience*.  
<https://doi.org/10.1021/cn500340j>
- Leonard, C. M. (1969). The prefrontal cortex of the rat. I. cortical projection of the mediodorsal nucleus. II. efferent connections. *Brain Research*, 12(2), 321–343.  
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(69\)90003-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(69)90003-1)
- Leonard, C. M. (2016). Finding prefrontal cortex in the rat. *Brain Research*, 1645, 1–3.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.02.002>

- Lesch, K. P., Bengel, D., Heils, A., Sabol, S. Z., Greenberg, B. D., Petri, S., Benjamin, J., Müller, C. R., Hamer, D. H., & Murphy, D. L. (1996). Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science (New York, N.Y.)*, *274*(5292), 1527–1531.
- Lim, L., Mi, D., Llorca, A., & Marín, O. (2018). Development and Functional Diversification of Cortical Interneurons. *Neuron*, *100*(2), 294–313. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.10.009>
- Lin, S.-H., Lee, L.-T., & Yang, Y. K. (2014). *Serotonin and Mental Disorders: A Concise Review on Molecular Neuroimaging Evidence*. *12*(3), 196–202. <https://doi.org/10.9758/cpn.2014.12.3.196>
- Lisman, J., Schulman, H., & Cline, H. (2002). The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nature Reviews Neuroscience*, *3*(3), 175–190. <https://doi.org/10.1038/nrn753>
- Liu, S., Zhou, L., Yuan, H., Vieira, M., Sanz-Clemente, A., Badger, J. D., Lu, W., Traynelis, S. F., & Roche, K. W. (2017). A Rare Variant Identified Within the GluN2B C-Terminus in a Patient with Autism Affects NMDA Receptor Surface Expression and Spine Density. *Journal of Neuroscience*, *37*(15), 4093–4102. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0827-16.2017>
- LoParo, D., & Waldman, I. D. (2015). The oxytocin receptor gene (OXTR) is associated with autism spectrum disorder: a meta-analysis. *Molecular Psychiatry*, *20*(5), 640–646. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.77>
- Lorente de Nó, R. (1938). Architectonics and structure of the cerebral cortex. En J. F. Fulton (Ed.), *Physiology of the Nervous System* (pp. 291–330). Oxford University Press.

- Lowry, C. A., & Hale, M. W. (2010). CHAPTER 3.6 - Serotonin and the Neurobiology of Anxious States. En C. P. M. and B. L. Jacobs (Ed.), *Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol. 21, pp. 379–397). Elsevier.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1569733910700916>
- Madden, A. M. K., & Zup, S. L. (2014). Effects of developmental hyperserotonemia on juvenile play behavior, oxytocin and serotonin receptor expression in the hypothalamus are age and sex dependent. *Physiology & Behavior*, 128, 260–269.  
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.01.036>
- Marek, G. J. (2010). CHAPTER 2.2 - Electrophysiology of Serotonin Receptors. En C. P. M. and B. L. Jacobs (Ed.), *Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol. 21, pp. 163–182). Elsevier.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1569733910700771>
- Maricq, A. V., Peterson, A. S., Brake, A. J., Myers, R. M., & Julius, D. (1991). Primary structure and functional expression of the 5HT<sub>3</sub> receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science*, 254(5030), 432–437. <https://doi.org/10.1126/science.1718042>
- Martin, M. M., Liu, Y., & Wang, Z. (2012). Developmental exposure to a serotonin agonist produces subsequent behavioral and neurochemical changes in the adult male prairie vole. *Physiology & Behavior*, 105(2), 529–535. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.09.015>
- Martín-Ruiz, R., Puig, M. V., Celada, P., Shapiro, D. A., Roth, B. L., Mengod, G., & Artigas, F. (2001). Control of serotonergic function in medial prefrontal cortex by serotonin-2A receptors through a glutamate-dependent mechanism. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(24), 9856–9866.

- Mayer, M. L., Westbrook, G. L., & Guthrie, P. B. (1984). Voltage-dependent block by Mg<sup>2+</sup> of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature*, 309(5965), 261–263. <https://doi.org/10.1038/309261a0>
- McBride, W. J. (2010). CHAPTER 3.7 - Role of Serotonin in Brain Reward and Regulation of Alcohol Drinking Behavior. En C. P. M. and B. L. Jacobs (Ed.), *Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol. 21, pp. 399–414). Elsevier. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1569733910700928>
- McCarthy, D., Luevas, P., & Bhide, P. G. (2007). Elevated dopamine levels during gestation produce region-specific decreases in neurogenesis and subtle deficits in neuronal numbers. *Brain Research*, 1182, 11–25. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.08.088>
- McNamara, I. M., Borella, A. W., Bialowas, L. A., & Whitaker-Azmitia, P. M. (2008). Further studies in the developmental hyperserotonemia model (DHS) of autism: social, behavioral and peptide changes. *Brain Research*, 1189, 203–214. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.10.063>
- Mengod, G., Cortés, R., Vilaró, M. T., & Hoyer, D. (2010). CHAPTER 1.6 - Distribution of 5-HT Receptors in the Central Nervous System. En C. P. M. and B. L. Jacobs (Ed.), *Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol. 21, pp. 123–138). Elsevier. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1569733910700746>
- Miceli, S., Negwer, M., van Eijs, F., Kalkhoven, C., van Lierop, I., Homberg, J., & Schubert, D. (2013). High serotonin levels during brain development alter the structural input-output connectivity of neural networks in the rat somatosensory layer IV. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, 88. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00088>

- Miller, E. K. (1999). The prefrontal cortex: complex neural properties for complex behavior. *Neuron*, 22(1), 15–17.
- Miller, E. K., & Wallis, J. D. (2013). Chapter 50 - The Prefrontal Cortex and Executive Brain Functions. En L. R. S. B. E. B. du L. G. C. Spitzer (Ed.), *Fundamental Neuroscience (Fourth Edition)* (pp. 1069–1089). Academic Press.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123858702000500>
- Milne, E., & Grafman, J. (2001). Ventromedial prefrontal cortex lesions in humans eliminate implicit gender stereotyping. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(12), RC150.
- Mochizuki, D., Hokonohara, T., Kawasaki, K., & Miki, N. (2002). Repeated administration of milnacipran induces rapid desensitization of somatodendritic 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors but not postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Journal of Psychopharmacology*, 16(3), 253–260.  
<https://doi.org/10.1177/026988110201600311>
- Modahl, C., Green, L., Fein, D., Morris, M., Waterhouse, L., Feinstein, C., & Levin, H. (1998). Plasma oxytocin levels in autistic children. *Biological Psychiatry*, 43(4), 270–277.
- Molnár, Z., & Cheung, A. F. P. (2006). Towards the classification of subpopulations of layer V pyramidal projection neurons. *Neuroscience Research*, 55(2), 105–115.  
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2006.02.008>
- Money, K. M., & Stanwood, G. D. (2013). Developmental origins of brain disorders: roles for dopamine. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7.  
<https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00260>
- Mori, H., & Mishina, M. (1995). Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology*, 34(10), 1219–1237. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(95\)00109-J](https://doi.org/10.1016/0028-3908(95)00109-J)

- Morilak, D. A., & Ciaranello, R. D. (1993). Ontogeny of 5-hydroxytryptamine<sub>2</sub> receptor immunoreactivity in the developing rat brain. *Neuroscience*, *55*(3), 869–880.
- Moskowitz, D. S., Pinard, G., Zuroff, D. C., Annable, L., & Young, S. N. (2003). Tryptophan, serotonin and human social behavior. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *527*, 215–224.
- Mountcastle, V. B. (1957). Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex. *Journal of Neurophysiology*, *20*(4), 408–434.  
<https://doi.org/10.1152/jn.1957.20.4.408>
- Mountcastle, V. B. (1997). The columnar organization of the neocortex. *Brain*, *120*(4), 701–722.  
<https://doi.org/10.1093/brain/120.4.701>
- Murrin, L. C., Sanders, J. D., & Bylund, D. B. (2007). Comparison of the maturation of the adrenergic and serotonergic neurotransmitter systems in the brain: implications for differential drug effects on juveniles and adults. *Biochemical Pharmacology*, *73*(8), 1225–1236. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.01.028>
- Nautiyal, K. M., & Hen, R. (2017). Serotonin receptors in depression: from A to B. *F1000Research*, *6*, 123. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9736.1>
- Negrete-Díaz, J. V., Sihra, T. S., Flores, G., & Rodríguez-Moreno, A. (2018). Non-canonical Mechanisms of Presynaptic Kainate Receptors Controlling Glutamate Release. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00128>
- Nichols, D. E., & Nichols, C. D. (2008). Serotonin receptors. *Chemical Reviews*, *108*(5), 1614–1641. <https://doi.org/10.1021/cr078224o>
- Niederkofler, V., Asher, T. E., & Dymecki, S. M. (2015). Functional Interplay between Dopaminergic and Serotonergic Neuronal Systems during Development and Adulthood.

- ACS *Chemical Neuroscience*, 6(7), 1055–1070.  
<https://doi.org/10.1021/acschemneuro.5b00021>
- Nilsson, K. W., Sjöberg, R. L., Damberg, M., Leppert, J., Ohrvik, J., Alm, P. O., Lindström, L., & Oreland, L. (2006). Role of monoamine oxidase A genotype and psychosocial factors in male adolescent criminal activity. *Biological Psychiatry*, 59(2), 121–127.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.06.024>
- Nilsson, K. W., Wargelius, H.-L., Sjöberg, R. L., Leppert, J., & Oreland, L. (2008). The MAO-A gene, platelet MAO-B activity and psychosocial environment in adolescent female alcohol-related problem behaviour. *Drug and Alcohol Dependence*, 93(1–2), 51–62.  
<https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2007.08.022>
- Nordquist, N., & Oreland, L. (2010). Serotonin, genetic variability, behaviour, and psychiatric disorders--a review. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 115(1), 2–10.  
<https://doi.org/10.3109/03009730903573246>
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., & Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*, 307(5950), 462–465.  
<https://doi.org/10.1038/307462a0>
- Oberlander, T. F. (2012). Fetal serotonin signaling: setting pathways for early childhood development and behavior. *The Journal of Adolescent Health: Official Publication of the Society for Adolescent Medicine*, 51(2 Suppl), S9-16.  
<https://doi.org/10.1016/j.jadohealth.2012.04.009>
- Oca, A. B. M. de, Gutiérrez, G. M., & Rodríguez, J. H. (2013). Molecular signaling of 5-HT1A and presence of serotonergic cells in the fetal cerebral cortex. *World Journal of Neuroscience*, 3(2), 76–82. <https://doi.org/10.4236/wjns.2013.32011>

- Olivier, J. D., Åkerud, H., Kaihola, H., Pawluski, J. L., Skalkidou, A., Högberg, U., & Sundström Poromaa, I. (2013). The effects of maternal depression and maternal selective serotonin reuptake inhibitor exposure on offspring. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00073>
- Olton, D. S., Wenk, G. L., Church, R. M., & Meck, W. H. (1988). Attention and the frontal cortex as examined by simultaneous temporal processing. *Neuropsychologia*, 26(2), 307–318. [https://doi.org/10.1016/0028-3932\(88\)90083-8](https://doi.org/10.1016/0028-3932(88)90083-8)
- Opris, I., & Casanova, M. F. (2014). Prefrontal cortical minicolumn: from executive control to disrupted cognitive processing. *Brain*, 137(7), 1863–1875. <https://doi.org/10.1093/brain/awt359>
- Opris, I., Chang, S., & Noga, B. R. (2017). What Is the Evidence for Inter-laminar Integration in a Prefrontal Cortical Minicolumn? *Frontiers in Neuroanatomy*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00116>
- Opris, I., Fuqua, J. L., Huettl, P. F., Gerhardt, G. A., Berger, T. W., Hampson, R. E., & Deadwyler, S. A. (2012). Closing the loop in primate prefrontal cortex: inter-laminar processing. *Frontiers in Neural Circuits*, 6, 88. <https://doi.org/10.3389/fncir.2012.00088>
- Opris, I., Santos, L., Gerhardt, G. A., Song, D., Berger, T. W., Hampson, R. E., & Deadwyler, S. A. (2013). Prefrontal cortical microcircuits bind perception to executive control. *Scientific Reports*, 3(1), 2285. <https://doi.org/10.1038/srep02285>
- Palomero-Gallagher, N., & Zilles, K. (2015). Chapter 22 - Isocortex. En G. Paxinos (Ed.), *The Rat Nervous System (Fourth Edition)* (pp. 601–625). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374245-2.00022-X>

- Paoletti, P., Bellone, C., & Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *14*(6), 383–400. <https://doi.org/10.1038/nrn3504>
- Paoletti, P., & Neyton, J. (2007). NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology*, *7*(1), 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2006.08.011>
- Park, S. B., Coull, J. T., McShane, R. H., Young, A. H., Sahakian, B. J., Robbins, T. W., & Cowen, P. J. (1994). Tryptophan depletion in normal volunteers produces selective impairments in learning and memory. *Neuropharmacology*, *33*(3–4), 575–588.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2004). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates - The New Coronal Set* (5 ed.). Academic Press.
- Peters, D. A. (1986). Prenatal stress increases the behavioral response to serotonin agonists and alters open field behavior in the rat. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *25*(4), 873–877. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(86\)90400-4](https://doi.org/10.1016/0091-3057(86)90400-4)
- Peters, D. A. (1990). Maternal stress increases fetal brain and neonatal cerebral cortex 5-hydroxytryptamine synthesis in rats: a possible mechanism by which stress influences brain development. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *35*(4), 943–947.
- Petralia, R. S., & Wenthold, R. J. (2008). NMDA Receptors. En R. W. Gereau & G. T. Swanson (Eds.), *The Glutamate Receptors* (pp. 45–98). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-055-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-055-3_2)
- Pompeiano, M., Palacios, J. M., & Mengod, G. (1992). Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT<sub>1A</sub> receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *12*(2), 440–453.

- Ponimaskin, E. G., Heine, M., Zeug, A., Voyno-Yasenetskaya, T., & Salonikidis, P. S. (2007). Chapter 2 - Monitoring Receptor-Mediated Changes of Intracellular cAMP Level by Using Ion Channels and Fluorescent Proteins as Biosensors. En A. Chattopadhyay (Ed.), *Serotonin Receptors in Neurobiology*. CRC Press.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5210/>
- Poorthuis, R. B., Bloem, B., Schak, B., Wester, J., de Kock, C. P. J., & Mansvelder, H. D. (2013). Layer-specific modulation of the prefrontal cortex by nicotinic acetylcholine receptors. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 23(1), 148–161.  
<https://doi.org/10.1093/cercor/bhr390>
- Poorthuis, R. B., & Mansvelder, H. D. (2013). Nicotinic acetylcholine receptors controlling attention: behavior, circuits and sensitivity to disruption by nicotine. *Biochemical Pharmacology*, 86(8), 1089–1098. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.07.003>
- Puig, M. V. (2011). Serotonergic Modulation of the Prefrontal Cortex: From Neurons to Brain Waves. En T. Uehara (Ed.), *Psychiatric Disorders - Worldwide Advances*. InTech.  
<http://www.intechopen.com/books/psychiatric-disorders-worldwide-advances/serotonergic-modulation-of-the-prefrontal-cortex-from-neurons-to-brain-waves>
- Puig, M. V., Celada, P., & Artigas, F. (2004). Control serotoninérgico de la corteza prefrontal. *Revista De Neurologia*, 39(6), 539–547.
- Puig, M. V., & Gullledge, A. T. (2011). Serotonin and prefrontal cortex function: neurons, networks, and circuits. *Molecular Neurobiology*, 44(3), 449–464.  
<https://doi.org/10.1007/s12035-011-8214-0>

- Puig, M. V., Santana, N., Celada, P., Mengod, G., & Artigas, F. (2004). In vivo excitation of GABA interneurons in the medial prefrontal cortex through 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, *14*(12), 1365–1375. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhh097>
- Puil, E., & Benjamin, A. M. (1988). Functional Organization of Glutamatergic Synapses. En M. Avoli, T. A. Reader, R. W. Dykes, & P. Gloor (Eds.), *Neurotransmitters and Cortical Function: From Molecules to Mind* (pp. 25–37). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0925-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0925-3_3)
- Purves, G. B. G. P. for R. in N. D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., Lamantia, A.-S., Mooney, R. D., Platt, M. L., & White, L. E. (Eds.). (2017). *Neuroscience* (6th ed.). Oxford University Press.
- R Core Team. (2019). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Raghanti, M. A., Spocter, M. A., Butti, C., Hof, P. R., & Sherwood, C. C. (2010). A comparative perspective on minicolumns and inhibitory GABAergic interneurons in the neocortex. *Frontiers in Neuroanatomy*, *4*. <https://doi.org/10.3389/neuro.05.003.2010>
- Rebello, T. J., Yu, Q., Goodfellow, N. M., Cagliostro, M. K. C., Teissier, A., Morelli, E., Demireva, E. Y., Chemiakine, A., Rosoklija, G. B., Dwork, A. J., Lambe, E. K., Gingrich, J. A., & Ansorge, M. S. (2014). Postnatal Day 2 to 11 Constitutes a 5-HT-Sensitive Period Impacting Adult mPFC Function. *Journal of Neuroscience*, *34*(37), 12379–12393. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1020-13.2014>
- Riad, M., Garcia, S., Watkins, K. C., Jodoin, N., Doucet, E., Langlois, X., el Mestikawy, S., Hamon, M., & Descarries, L. (2000). Somatodendritic localization of 5-HT<sub>1A</sub> and

- preterminal axonal localization of 5-HT<sub>1B</sub> serotonin receptors in adult rat brain. *The Journal of Comparative Neurology*, *417*(2), 181–194.
- Riccio, O., Jacobshagen, M., Golding, B., Vutskits, L., Jabaudon, D., Hornung, J. P., & Dayer, A. G. (2011). Excess of serotonin affects neocortical pyramidal neuron migration. *Translational Psychiatry*, *1*(10), e47–e47. <https://doi.org/10.1038/tp.2011.49>
- Riccio, O., Potter, G., Walzer, C., Vallet, P., Szabó, G., Vutskits, L., Kiss, J. Z., & Dayer, A. G. (2009). Excess of serotonin affects embryonic interneuron migration through activation of the serotonin receptor 6. *Molecular Psychiatry*, *14*(3), 280–290. <https://doi.org/10.1038/mp.2008.89>
- Richardson-Jones, J. W., Craige, C. P., Guiard, B. P., Stephen, A., Metzger, K. L., Kung, H. F., Gardier, A. M., Dranovsky, A., David, D. J., Beck, S. G., Hen, R., & Leonardo, E. D. (2010). 5-HT<sub>1A</sub> Autoreceptor Levels Determine Vulnerability to Stress and Response to Antidepressants. *Neuron*, *65*(1), 40–52. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.12.003>
- Richardson-Jones, J. W., Craige, C. P., Nguyen, T. H., Kung, H. F., Gardier, A. M., Dranovsky, A., David, D. J., Guiard, B. P., Beck, S. G., Hen, R., & Leonardo, E. D. (2011). Serotonin-1A Autoreceptors Are Necessary and Sufficient for the Normal Formation of Circuits Underlying Innate Anxiety. *Journal of Neuroscience*, *31*(16), 6008–6018. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5836-10.2011>
- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C., & Gerhard, D. (2015). Dose-Response Analysis Using R. *PLOS ONE*, *10*(12), e0146021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146021>
- Robbins, T. W., & Crockett, M. J. (2010). CHAPTER 3.8 - Role of Central Serotonin in Impulsivity and Compulsivity: Comparative Studies in Experimental Animals and Humans. En C. P. M. and B. L. Jacobs (Ed.), *Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol.

- 21, pp. 415–427). Elsevier.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S156973391070093X>
- Rockland, K. S., & Ichinohe, N. (2004). Some thoughts on cortical minicolumns. *Experimental Brain Research*, *158*(3), 265–277. <https://doi.org/10.1007/s00221-004-2024-9>
- Rodrigues, R. J., & Lerma, J. (2012). Metabotropic signaling by kainate receptors. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling*, *1*(4), 399–410. <https://doi.org/10.1002/wmts.35>
- Rogers, R. D., Blackshaw, A. J., Middleton, H. C., Matthews, K., Hawtin, K., Crowley, C., Hopwood, A., Wallace, C., Deakin, J. F., Sahakian, B. J., & Robbins, T. W. (1999). Tryptophan depletion impairs stimulus-reward learning while methylphenidate disrupts attentional control in healthy young adults: implications for the monoaminergic basis of impulsive behaviour. *Psychopharmacology*, *146*(4), 482–491.
- Rogers, R. D., Owen, A. M., Middleton, H. C., Williams, E. J., Pickard, J. D., Sahakian, B. J., & Robbins, T. W. (1999). Choosing between small, likely rewards and large, unlikely rewards activates inferior and orbital prefrontal cortex. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *19*(20), 9029–9038.
- Rose, J. E., & Woolsey, C. N. (1948). The orbitofrontal cortex and its connections with the mediodorsal nucleus in rabbit, sheep and cat. *Research Publications - Association for Research in Nervous and Mental Disease*, *27* (1 vol.), 210–232.
- Rossetti, Z. L., & Carboni, S. (2005). Noradrenaline and dopamine elevations in the rat prefrontal cortex in spatial working memory. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *25*(9), 2322–2329. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3038-04.2005>

- Rubenstein, J. L. (1998). Development of serotonergic neurons and their projections. *Biological Psychiatry*, *44*(3), 145–150.
- Rubenstein, J. L. R., & Merzenich, M. M. (2003). Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes, Brain, and Behavior*, *2*(5), 255–267.
- Ruediger, T., & Bolz, J. (2007). Neurotransmitters and the Development of Neuronal Circuits. In D. Bagnard (Ed.), *Axon Growth and Guidance* (pp. 104–114). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-76715-4\\_8](https://doi.org/10.1007/978-0-387-76715-4_8)
- Sanders, S. J., Murtha, M. T., Gupta, A. R., Murdoch, J. D., Raubeson, M. J., Willsey, A. J., Ercan-Sencicek, A. G., DiLullo, N. M., Parikshak, N. N., Stein, J. L., Walker, M. F., Ober, G. T., Teran, N. A., Song, Y., El-Fishawy, P., Murtha, R. C., Choi, M., Overton, J. D., Bjornson, R. D., ... State, M. W. (2012). De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. *Nature*, *485*(7397), 237–241. <https://doi.org/10.1038/nature10945>
- Santana, N., & Artigas, F. (2017). Laminar and Cellular Distribution of Monoamine Receptors in Rat Medial Prefrontal Cortex. *Frontiers in Neuroanatomy*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00087>
- Sawaguchi, T., Matsumura, M., & Kubota, K. (1986). Dopamine modulates neuronal activities related to motor performance in the monkey prefrontal cortex. *Brain Research*, *371*(2), 404–408.
- Sceniak, M. P., Fedder, K. N., Wang, Q., Droubi, S., Babcock, K., Patwardhan, S., Wright-Zornes, J., Pham, L., & Sabo, S. L. (2019). An autism-associated mutation in GluN2B prevents NMDA receptor trafficking and interferes with dendrite growth. *Journal of Cell Science*, *132*(20). <https://doi.org/10.1242/jcs.232892>

- Schain, R. J., & Freedman, D. X. (1961). Studies on 5-hydroxyindole metabolism in autistic and other mentally retarded children. *The Journal of Pediatrics*, 58(3), 315–320. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(61\)80261-8](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(61)80261-8)
- Schmid, C. L., Raehal, K. M., & Bohn, L. M. (2008). Agonist-directed signaling of the serotonin 2A receptor depends on  $\beta$ -arrestin-2 interactions in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(3), 1079–1084. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708862105>
- Schneider, M., & Koch, M. (2005). Deficient social and play behavior in juvenile and adult rats after neonatal cortical lesion: effects of chronic pubertal cannabinoid treatment. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 30(5), 944–957. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300634>
- Schultz, W., Dayan, P., & Montague, P. R. (1997). A neural substrate of prediction and reward. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5306), 1593–1599.
- Schultz, W., Tremblay, L., & Hollerman, J. R. (2000). Reward processing in primate orbitofrontal cortex and basal ganglia. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 10(3), 272–284.
- Seamans, J. K., & Yang, C. R. (2004). The principal features and mechanisms of dopamine modulation in the prefrontal cortex. *Progress in Neurobiology*, 74(1), 1–58. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2004.05.006>
- Seyedabadi, M., Fakhfouri, G., Ramezani, V., Mehr, S. E., & Rahimian, R. (2014). The role of serotonin in memory: interactions with neurotransmitters and downstream signaling. *Experimental Brain Research*, 232(3), 723–738. <https://doi.org/10.1007/s00221-013-3818-4>

- Shah, R., Courtiol, E., Castellanos, F. X., & Teixeira, C. M. (2018). Abnormal Serotonin Levels During Perinatal Development Lead to Behavioral Deficits in Adulthood. *Frontiers in Behavioral Neuroscience, 12*. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00114>
- Shemer, A. V., Azmitia, E. C., & Whitaker-Azmitia, P. M. (1991). Dose-related effects of prenatal 5-methoxytryptamine (5-MT) on development of serotonin terminal density and behavior. *Developmental Brain Research, 59*(1), 59–63. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(91\)90029-I](https://doi.org/10.1016/0165-3806(91)90029-I)
- Shemer, A. V., Whitaker-Azmitia, P. M., & Azmitia, E. C. (1988). Effects of prenatal 5-methoxytryptamine and parachlorophenylalanine on serotonergic uptake and behavior in the neonatal rat. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior, 30*(4), 847–851.
- Sjöberg, R. L., Nilsson, K. W., Nordquist, N., Ohrvik, J., Leppert, J., Lindström, L., & Orelund, L. (2006). Development of depression: sex and the interaction between environment and a promoter polymorphism of the serotonin transporter gene. *The International Journal of Neuropsychopharmacology / Official Scientific Journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP), 9*(4), 443–449. <https://doi.org/10.1017/S1461145705005936>
- Sodhi, M. S. K., & Sanders-Bush, E. (2004). Serotonin and brain development. *International Review of Neurobiology, 59*, 111–174. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(04\)59006-2](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(04)59006-2)
- Sommer, C. (2010). CHAPTER 3.11 - Serotonin in Pain and Pain Control. En C. P. M. and B. L. Jacobs (Ed.), *Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol. 21, pp. 457–471). Elsevier. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1569733910700965>
- Sprowles, J. L. N., Hufgard, J. R., Gutierrez, A., Bailey, R. A., Jablonski, S. A., Williams, M. T., & Vorhees, C. V. (2017). Differential effects of perinatal exposure to antidepressants on

- learning and memory, acoustic startle, anxiety, and open-field activity in Sprague-Dawley rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 61(C), 92–111. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2017.06.004>
- Stefani, A., Chen, Q., Flores-Hernandez, J., Jiao, Y., Reiner, A., & Surmeier, D. J. (1998). Physiological and Molecular Properties of AMPA/Kainate Receptors Expressed by Striatal Medium Spiny Neurons. *Developmental Neuroscience*, 20(2–3), 242–252. <https://doi.org/10.1159/000017318>
- St-Pierre, J., Laurent, L., King, S., & Vaillancourt, C. (2016). Effects of prenatal maternal stress on serotonin and fetal development. *Placenta*, 48, S66–S71. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.11.013>
- Strakowski, S. M., Adler, C. M., Almeida, J., Altshuler, L. L., Blumberg, H. P., Chang, K. D., DelBello, M. P., Frangou, S., McIntosh, A., Phillips, M. L., Sussman, J. E., & Townsend, J. D. (2012). The functional neuroanatomy of bipolar disorder: a consensus model. *Bipolar Disorders*, 14(4), 313–325. <https://doi.org/10.1111/j.1399-5618.2012.01022.x>
- Sundström, E., Kölare, S., Souverbie, F., Samuelsson, E. B., Pschera, H., Lunell, N. O., & Seiger, A. (1993). Neurochemical differentiation of human bulbospinal monoaminergic neurons during the first trimester. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 75(1), 1–12.
- Suri, D., Teixeira, C. M., Cagliostro, M. K. C., Mahadevia, D., & Ansorge, M. S. (2015). Monoamine-sensitive developmental periods impacting adult emotional and cognitive behaviors. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 40(1), 88–112. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.231>

- Surmeier, D. J., Song, W. J., & Yan, Z. (1996). Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *16*(20), 6579–6591.
- Tremblay, R., Lee, S., & Rudy, B. (2016). GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. *Neuron*, *91*(2), 260–292. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.06.033>
- Uphouse, L., & Guptarak, J. (2010). CHAPTER 3.4 - Serotonin and Sexual Behavior. En C. P. M. and B. L. Jacobs (Ed.), *Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol. 21, pp. 347–365). Elsevier. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1569733910700898>
- Uylings, Harry B. M., Groenewegen, H. J., & Kolb, B. (2003). Do rats have a prefrontal cortex? *Behavioural Brain Research*, *146*(1–2), 3–17.
- Uylings, Harry B. M., & van Eden, C. G. (1991). Chapter 3 Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in rat and in primates, including humans. En H. B. M. Uylings, C. G. Van Eden, J. P. C. De Bruin, M. A. Corner, & M. G. P. Feenstra (Eds.), *Progress in Brain Research* (Vol. 85, pp. 31–62). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)62675-8](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)62675-8)
- van Aerde, K. I., & Feldmeyer, D. (2015). Morphological and Physiological Characterization of Pyramidal Neuron Subtypes in Rat Medial Prefrontal Cortex. *Cerebral Cortex*, *25*(3), 788–805. <https://doi.org/10.1093/cercor/bht278>
- Velasquez, J. C., Goeden, N., & Bonnin, A. (2013). Placental serotonin: implications for the developmental effects of SSRIs and maternal depression. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*, 47. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00047>

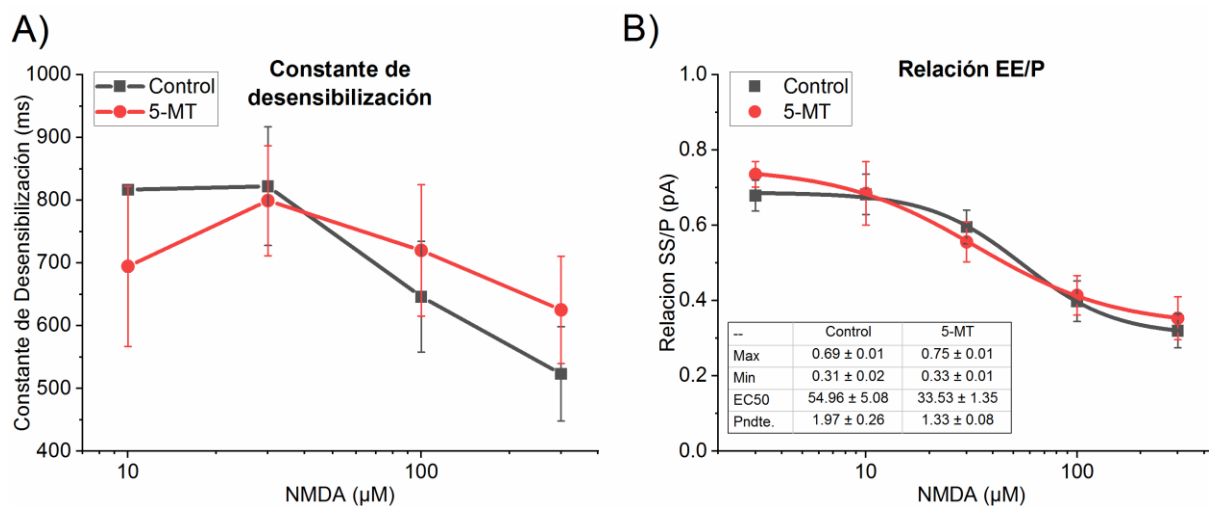
- Vicini, S., Wang, J. F., Li, J. H., Zhu, W. J., Wang, Y. H., Luo, J. H., Wolfe, B. B., & Grayson, D. R. (1998). Functional and Pharmacological Differences Between Recombinant N-Methyl-d-Aspartate Receptors. *Journal of Neurophysiology*, 79(2), 555–566. <https://doi.org/10.1152/jn.1998.79.2.555>
- Vitalis, T., Cases, O., Callebert, J., Launay, J.-M., Price, D. J., Seif, I., & Gaspar, P. (1998). Effects of monoamine oxidase A inhibition on barrel formation in the mouse somatosensory cortex: Determination of a sensitive developmental period. *Journal of Comparative Neurology*, 393(2), 169–184. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19980406\)393:2<169::AID-CNE3>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19980406)393:2<169::AID-CNE3>3.0.CO;2-0)
- Vitalis, T., Cases, O., Passemard, S., Callebert, J., & Parnavelas, J. G. (2007). Embryonic depletion of serotonin affects cortical development. *European Journal of Neuroscience*, 26(2), 331–344. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05661.x>
- Vitalis, T., & Parnavelas, J. G. (2003). The role of serotonin in early cortical development. *Developmental Neuroscience*, 25(2–4), 245–256. <https://doi.org/10.1159/000072272>
- Vogt, B. A. (2015). Chapter 21 - Cingulate Cortex and Pain Architecture. En G. Paxinos (Ed.), *The Rat Nervous System (Fourth Edition)* (pp. 575–599). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374245-2.00021-8>
- von Bohlen und Halbach, O., & Dermietzel, R. (2006). *Neurotransmitters and Neuromodulators: Handbook of Receptors and Biological Effects* (2nd ed.). Wiley-VCH.
- Wedzony, K., Chocyk, A., & Maćkowiak, M. (2008). A search for colocalization of serotonin 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the rat medial prefrontal and entorhinal cortices--immunohistochemical studies. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 59(2), 229–238.

- Whitaker-Azmitia, P. M. (2001). Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. *Brain Research Bulletin*, *56*(5), 479–485.
- Whitaker-Azmitia, P. M. (2005). Behavioral and cellular consequences of increasing serotonergic activity during brain development: a role in autism? *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, *23*(1), 75–83.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2004.07.022>
- Whitaker-Azmitia, P. M. (2010). CHAPTER 3.1 - Serotonin and Development. En Christian P. Müller and Barry L. Jacobs (Ed.), *Handbook of Behavioral Neuroscience: Vol. Volume 21* (pp. 309–323). Elsevier.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1569733910700862>
- Whitaker-Azmitia, P. M., & Azmitia, E. C. (1986). Autoregulation of fetal serotonergic neuronal development: role of high affinity serotonin receptors. *Neuroscience Letters*, *67*(3), 307–312.
- Whitaker-Azmitia, P. M., Lauder, J. M., Shemmer, A., & Azmitia, E. C. (1987). Postnatal changes in serotonin receptors following prenatal alterations in serotonin levels: further evidence for functional fetal serotonin receptors. *Brain Research*, *430*(2), 285–289.
- Willsey, A. J., Sanders, S. J., Li, M., Dong, S., Tebbenkamp, A. T., Muhle, R. A., Reilly, S. K., Lin, L., Fertuzinhos, S., Miller, J. A., Murtha, M. T., Bichsel, C., Niu, W., Cotney, J., Ercan-Sencicek, A. G., Gockley, J., Gupta, A. R., Han, W., He, X., ... State, M. W. (2013). Coexpression Networks Implicate Human Midfetal Deep Cortical Projection Neurons in the Pathogenesis of Autism. *Cell*, *155*(5), 997–1007.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.020>

- Womer, F. Y., Kalmar, J. H., Wang, F., & Blumberg, H. P. (2009). A ventral prefrontal-amygdala neural system in bipolar disorder: a view from neuroimaging research. *Acta Neuropsychiatrica*, *21*(5), 228–238. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5215.2009.00414.x>
- Yadav, P. N., Abbas, A. I., Farrell, M. S., Setola, V., Sciaky, N., Huang, X.-P., Kroeze, W. K., Crawford, L. K., Piel, D. A., Keiser, M. J., Irwin, J. J., Shoichet, B. K., Deneris, E. S., Gingrich, J., Beck, S. G., & Roth, B. L. (2011). The Presynaptic Component of the Serotonergic System is Required for Clozapine's Efficacy. *Neuropsychopharmacology*, *36*(3), 638–651. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.195>
- Yang, Y., & Raine, A. (2009). Prefrontal structural and functional brain imaging findings in antisocial, violent, and psychopathic individuals: a meta-analysis. *Psychiatry Research*, *174*(2), 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.psychresns.2009.03.012>
- Yuan, P., & Raz, N. (2014). Prefrontal cortex and executive functions in healthy adults: A meta-analysis of structural neuroimaging studies. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *42*, 180–192. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.02.005>
- Yuen, E. Y., Jiang, Q., Chen, P., Feng, J., & Yan, Z. (2008). Activation of 5-HT<sub>2A/C</sub> receptors counteracts 5-HT<sub>1A</sub> regulation of n-methyl-D-aspartate receptor channels in pyramidal neurons of prefrontal cortex. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(25), 17194–17204. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801713200>
- Yuen, E. Y., Jiang, Q., Chen, P., Gu, Z., Feng, J., & Yan, Z. (2005). Serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptors regulate NMDA receptor channels through a microtubule-dependent mechanism. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *25*(23), 5488–5501. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1187-05.2005>

- Zhang, Z., Cordeiro Matos, S., Jego, S., Adamantidis, A., & Séguéla, P. (2013). Norepinephrine drives persistent activity in prefrontal cortex via synergistic  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  adrenoceptors. *PloS One*, 8(6), e66122. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066122>
- Zhong, P., Yuen, E. Y., & Yan, Z. (2008). Modulation of neuronal excitability by serotonin-NMDA interactions in prefrontal cortex. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 38(2), 290–299. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2008.03.003>
- Zilles, K., Schleicher, A., Glaser, T., Traber, J., & Rath, M. (1985). The ontogenetic development of serotonin (5-HT<sub>1</sub>) receptors in various cortical regions of the rat brain. *Anatomy and Embryology*, 172(3), 255–264.
- Zito, K., & Scheuss, V. (2009). NMDA Receptor Function and Physiological Modulation. En L. R. Squire (Ed.), *Encyclopedia of Neuroscience* (pp. 1157–1164). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.01225-0>

## ANEXO 1: CONSTANTE DE DESENSIBILIZACIÓN Y RELACIÓN EE/P



**Figure S 1:** Constante de desensibilización ( $\tau$ ) y relación EE/P para cada una de las concentraciones de NMDA utilizadas (0.3, 1, 3, 10, 30, 100 y 300  $\mu\text{M}$ ). Los datos de la  $\tau$  (A) no se ajustaron a ninguna de las curvas utilizadas, ni presentaron diferencias significativas entre los grupos. Cabe resaltar que en concentraciones menores a 10  $\mu\text{M}$  la corriente no presenta un pico visible, por lo cual la  $\tau$  no pudo ser calculada para esos valores. Por otra parte, los valores de la relación EE/P (B) se ajustaron a una curva logística, sin presentar diferencias significativas entre ellas, modo similar tampoco se encontró diferencia significativa entre los datos.

**Tabla S 1:** Valores de la constante de desensibilización y la relación EE/P para cada una de las concentraciones de NMDA utilizadas

NMDA( $\mu\text{M}$ )	Constante de Desensibilización (ms)		Relación EE/P	
	Control	5-MT	Control	5-MT
0.3	--	--	--	--
1	--	--	--	--
3	--	--	0.68±0.04 (9)	0.74±0.03 (9)
10	816.79± -- (1)	696.59±127.49 (4)	0.68±0.05 (9)	0.68±0.08 (9)
30	822.42±94.54 (9)	799.44±87.72 (9)	0.60±0.04 (9)	0.56±0.05 (9)
100	646.30±88.11 (9)	720.11±104.71 (9)	0.40±0.05 (9)	0.41±0.05 (9)
300	523.27±75.24 (9)	625.27±85.69 (9)	0.32±0.05 (9)	0.35±0.07 (9)

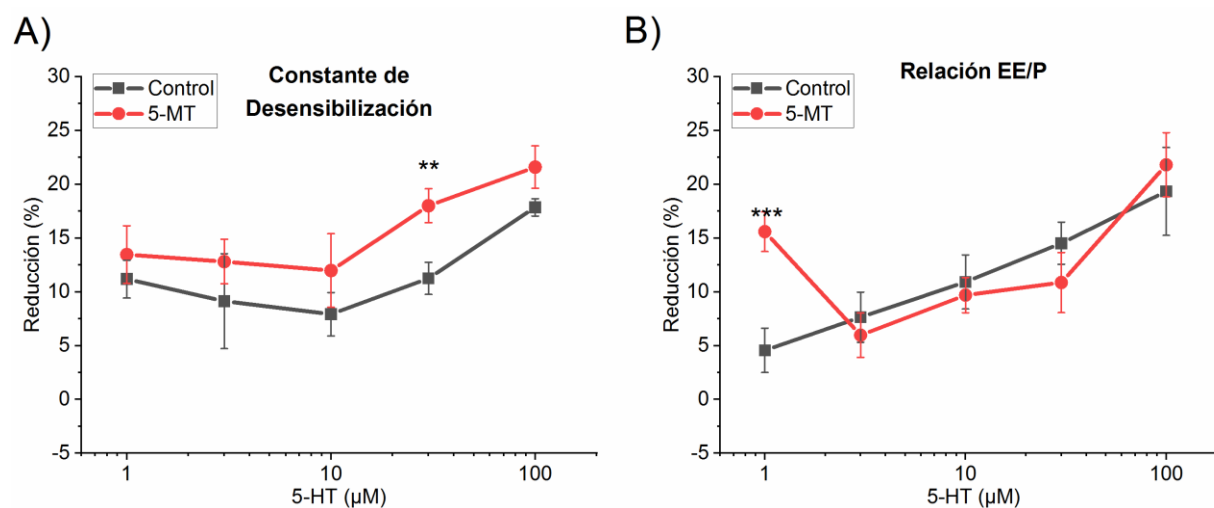
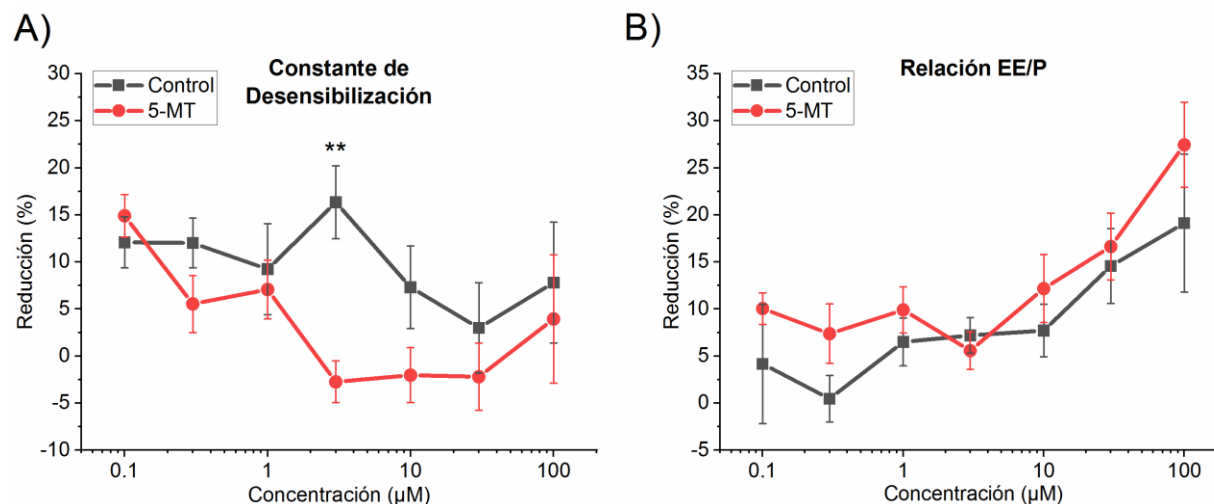


Figure S 2: Reducción de la constante de desensibilización ( $\tau$ ) y la relación EE/P para cada una de las concentraciones de 5-HT utilizadas (1, 3, 10, 30 y 100  $\mu\text{M}$ ). Los valores de ninguno de los dos parámetros se ajustaron a las curvas probadas. Al probar la diferencia entre los grupos para cada concentración, a nivel de la  $\tau$  (A) se encontró diferencia significativa para la concentración de 30  $\mu\text{M}$  ( $t_{27,99} = -3.58$ ;  $p = 0.001$ ). Por otra parte, a nivel de la relación EE/P (B) se encontró diferencia para la concentración de 1  $\mu\text{M}$  ( $t_{17,75} = -3.99$ ;  $p < 0.001$ ). Código de Significancia:  $p < 0.001$  (\*\*\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.05$  (\*).

Tabla S 2: Valores de la constante de desensibilización y la relación EE/P para cada una de las concentraciones de 5-HT utilizadas

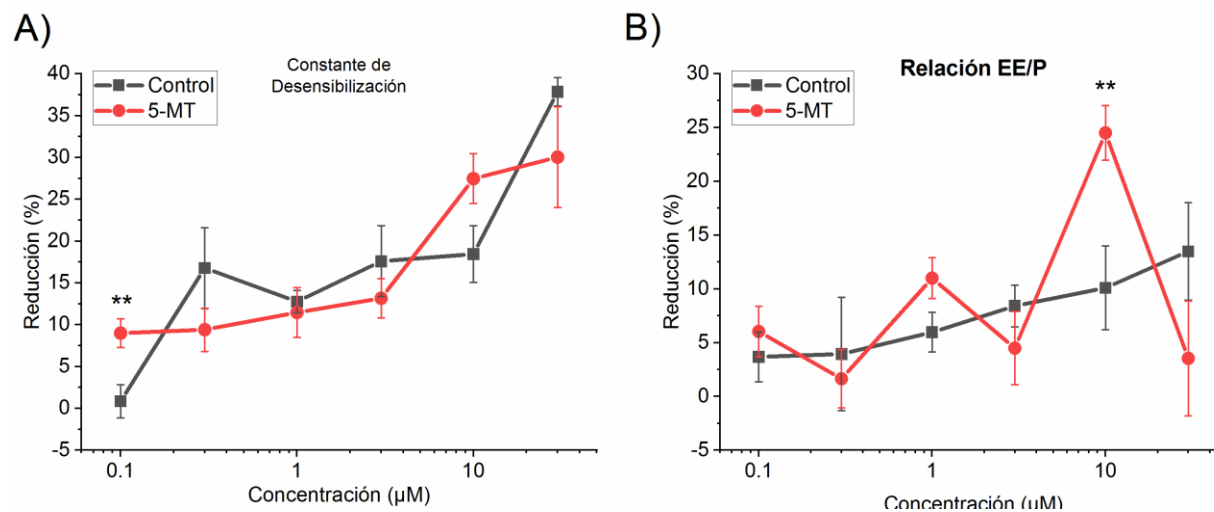
5-HT( $\mu\text{M}$ )	Constante de Desensibilización (ms)		Relación EE/P	
	Control	5-MT	Control	5-MT
<b>1</b>	11.19±1.75 (13)	13.47±2.67 (7)	4.57±2.06 (13)	15.60±1.85 (7)
<b>3</b>	9.14±4.42 (9)	12.82±2.07 (13)	7.65±2.33 (9)	5.98±2.06 (13)
<b>10</b>	7.93±2.02 (14)	11.99±3.42 (11)	10.92±2.51 (14)	9.70±1.63 (11)
<b>30</b>	11.25±1.49 (16)	18.01±1.57 (16)	14.53±1.96 (16)	10.87±2.80 (16)
<b>100</b>	17.87±0.80 (12)	21.60±1.97 (14)	19.34±4.09 (12)	21.82±2.99 (14)



**Figure 5 3:** Reducción de la constante de desensibilización ( $\tau$ ) y la relación EE/P para cada una de las concentraciones de 8-OH-DPAT utilizadas (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 y 100  $\mu\text{M}$ ). Los valores de ninguno de los dos parámetros se ajustaron a las curvas probadas. Al probar la diferencia entre los grupos para cada concentración, únicamente se encontró diferencia significativa para la concentración de 3  $\mu\text{M}$  ( $t_{9,95}=4.28$ ;  $p=0.001$ ) a nivel de la  $\tau$  (A). A nivel de la Relación EE/P (B) no se encontró diferencia significativa para ninguna concentración. Código de Significancia:  $p<0.001$  (\*\*\*),  $p<0.01$  (\*\*),  $p<0.05$  (\*).

**Tabla 5 3:** Valores de la constante de desensibilización y la relación EE/P para cada una de las concentraciones de 8-OH-DPAT utilizadas

8-OH-DPAT ( $\mu\text{M}$ )	Constante de Desensibilización (ms)		Relación EE/P	
	Control	5-MT	Control	5-MT
<b>0.1</b>	12.09±2.71 (8)	14.91±2.25 (11)	4.17±6.35 (8)	10.05±1.68 (11)
<b>0.3</b>	12.02±2.63 (9)	5.55±3.04 (13)	0.47±2.47 (9)	7.38±3.15 (13)
<b>1</b>	9.24±4.83 (8)	7.08±3.13 (11)	6.51±2.54 (8)	9.91±2.45 (11)
<b>3</b>	16.33±3.87 (7)	-2.74±2.22 (11)	7.20±1.89 (7)	5.59±2.02 (11)
<b>10</b>	7.31±4.37 (9)	-2.02±2.92 (10)	7.72±2.79 (9)	12.18±3.62 (10)
<b>30</b>	3.00±4.79 (9)	-2.19±3.56 (11)	14.57±3.97 (9)	16.65±3.54 (11)
<b>100</b>	7.82±6.41 (7)	3.95±6.83 (10)	19.13±7.33 (7)	27.46±4.51 (10)



**Figure S 4:** Reducción de la constante de desensibilización ( $\tau$ ) y la relación EE/P para cada una de las concentraciones de DOI utilizadas (0.1, 0.3, 1, 3, 10 y 30  $\mu\text{M}$ ). Los valores de ninguno de los dos parámetros se ajustaron a las curvas probadas. Al probar la diferencia entre los grupos para cada concentración, se encontró diferencia significativa para la concentración de 0.1  $\mu\text{M}$  ( $t_{14,20}=-3.11$ ;  $p=0.007$ ) a nivel de la  $\tau$  (A). Por otra parte, a nivel de la Relación EE/P (B) la concentración de 10  $\mu\text{M}$  presenta diferencia significativa ( $t_{11,17}=-3.10$ ;  $p=0.009$ ). Código de Significancia:  $p<0.001$  (\*\*\*) ,  $p<0.01$  (\*\*),  $p<0.05$  (\*).

**Tabla S 4:** Valores de la constante de desensibilización y la relación EE/P para cada una de las concentraciones de DOI utilizadas

DOI ( $\mu\text{M}$ )	Constante de Desensibilización (ms)		Relación EE/P	
	Control	5-MT	Control	5-MT
<b>0.1</b>	0.86±1.99 (7)	9.00±1.70 (13)	3.67±2.31 (7)	6.04±2.33 (13)
<b>0.3</b>	16.78±4.83 (12)	9.40±2.59 (14)	3.95±5.28 (12)	1.65±2.71 (14)
<b>1</b>	12.76±1.34 (7)	11.47±2.98 (13)	5.97±1.84 (7)	10.99±1.89 (13)
<b>3</b>	17.60±4.24 (12)	13.17±2.34 (14)	8.41±1.94 (12)	4.49±3.41 (14)
<b>10</b>	18.45±3.37 (7)	27.47±2.98 (13)	10.10±3.89 (7)	24.51±2.54 (13)
<b>30</b>	37.85±1.71 (12)	30.03±6.01 (14)	13.48±4.52 (12)	3.54±5.33 (14)

# Changes in Serotonin Modulation of Glutamate Currents in Pyramidal Offspring Cells of Rats Treated with 5-MT during Gestation

**Autores:**

Gustavo Hernández-Carballo, Evelyn A. Ruíz-Luna, Gustavo López-López, Elias Manjarrez and Jorge Flores-Hernández

**Publicado:** 8 April 2020 en <https://www.mdpi.com/2076-3425/10/4/221>

Article

# Changes in Serotonin Modulation of Glutamate Currents in Pyramidal Offspring Cells of Rats Treated With 5-MT during Gestation

Gustavo Hernández-Carballo <sup>1</sup>, Evelyn A. Ruíz-Luna <sup>1</sup>, Gustavo López-López <sup>2</sup>,  
Eliás Manjarrez <sup>1</sup> and Jorge Flores-Hernández <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Fisiología Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla C.P.72570, Mexico; l.gustavoh.carballo@gmail.com (G.H.-C.); evy\_0927@hotmail.com (E.A.R.-L.); eliasmanjarrez@gmail.com (E.M.)

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Químicas Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla C.P.72570, Mexico; jose.lopez@correo.buap.mx

\* Correspondence: jorge.flores@correo.buap.mx; Tel.: +52-222-229-5500 (ext. 7325)

Received: 27 February 2020; Accepted: 3 April 2020; Published: 8 April 2020



**Abstract:** Changes in stimuli and feeding in pregnant mothers alter the behavior of offspring. Since behavior is mediated by brain activity, it is expected that postnatal changes occur at the level of currents, receptors or soma and dendrites structure and modulation. In this work, we explore at the mechanism level the effects on Sprague–Dawley rat offspring following the administration of serotonin (5-HT) agonist 5-methoxytryptamine (5-MT). We analyzed whether 5-HT affects the glutamate-activated ( $I_{\text{Glut}}$ ) and N-methyl-D-aspartate (NMDA)-activated currents ( $I_{\text{Glut}}$ ,  $I_{\text{NMDA}}$ ) in dissociated pyramidal neurons from the prefrontal cortex (PFC). For this purpose, we performed voltage-clamp experiments on pyramidal neurons from layers V–VI of the PFC of 40-day-old offspring born from 5-MT-treated mothers at the gestational days (GD) 11 to 21. We found that the pyramidal-neurons from the PFC of offspring of mothers treated with 5-MT exhibit a significant increased reduction in both the  $I_{\text{Glut}}$  and  $I_{\text{NMDA}}$  when 5-HT was administered. Our results suggest that the concentration increase of a neuromodulator during the gestation induces changes in its modulatory action over the offspring ionic currents during the adulthood thus contributing to possible psychiatric disorders.

**Keywords:** neurotransmitters; development; neurodevelopment; neuromodulation; 5-HT; hyperserotonemia; 5-MT; glutamate; NMDA; ionic currents

## 1. Introduction

The study of neuromodulators and their influences on voltage-gated and synapse-driven currents are of great interest [1–7]. In particular, 5-HT catches our attention for its wide distribution on the brain, as well as its role in a large number of behaviors that range from learning and memory to social behavior [8–10]. Also, increasing evidence points to alteration of 5-HT signaling as a crucial development component of multiple psychiatric conditions such as schizophrenia, mood disorders, anxiety, and depression [11–14].

Neuromodulators play an orchestrator role in cellular proliferation, migration, and differentiation during gestational development, giving shape to neuronal communication and circuits [15–18]. In this context, the study of the 5-HT system is highlighted due to its early development, which is evident from the fifth week of gestation in humans [19] and GD12 in rodents [20,21]. However, the expression of receptors and other serotonergic structures before the development of its innervation [22] suggests the existence of an exogenous source of 5-HT, which is maternal–placental [23].

Several works have proposed that altering serotonergic homeostasis during offspring's pre- and post-natal development results in a predisposition to psychiatric disorders [24–28]. Studies where the concentration of 5-HT is altered in sensitive or critical periods of fetal development show behavioral, cognitive, and emotional abnormalities [29,30], as well as changes in dendritic complexity [31,32] and cellular survival [33] and migration [34,35]. In particular, the artificial increase in the concentration of serotonin using 5-HT transporters (SERT) or monoamine oxidase (MAO) inhibitors, and 5-HT agonists such as 5-MT, induces several brain disorders, for instance, affective abnormalities, cognitive and fear extinction deficiencies, anxiety-like behaviors [36,37], changes in the expression of 5-HT receptors [38–40], abnormalities in the laminar and columnar organization [41–43] and the excitability of areas such as the PFC [44].

Particularly, the PFC is densely innervated by axons from the main monoaminergic nuclei, such as the ventral tegmental area and raphe nuclei, which in turn receive projections from the deep layers of the PFC as do multiple cortical and subcortical regions [45]. For this reason, alteration or failure of the processes that regulate the development of proper PFC functioning results in reduced intercommunication within areas [46–48], as well as changes in the chemical balance that contributes to multiple cognitive deficits observed in various neuropsychiatric disorders [49].

Through the use of optogenetic inhibition of layer V pyramidal neurons on the valproic acid model [50] or the construction of genetic co-expression networks [51], studies show that neurons in the prefrontal cortex found in layers V–VI are related to the etiology of autism, identifying the fetal stage as the time of greatest sensitivity to the mutations responsible of the disorder.

Based on the foregoing, this work aims to demonstrate the effect of 5-HT on  $I_{\text{NMDA}}$  and  $I_{\text{Glut}}$  in dissociated pyramidal neurons of the offspring of rats treated with a serotonergic agonist during pregnancy. We demonstrate that treatment has a controlling influence on the modulatory action of 5-HT on  $I_{\text{NMDA}}$  and  $I_{\text{Glut}}$ .

We consider that our work contributes to the understanding and interpretation of the effect of maternal stress and inflammation during pregnancy since both increase the placental output of 5-HT to the fetal brain [27,52–55]. An increasing amount of evidence associates the use of selective 5-HT reuptake inhibitors (SSRIs) during pregnancy with changes in brain morphology and neurodevelopmental disorders [56–58]. In the present study, 5-MT, a non-selective serotonin agonist, was applied to pregnant rats in order to examine whether or not such treatment alters the offspring's serotonergic modulation of  $I_{\text{NMDA}}$  and  $I_{\text{Glut}}$ .

Our results indicate that the offspring from mothers treated with 5-MT during gestation exhibit a statistically significant increase in the 5-HT inhibitory effect on the  $I_{\text{NMDA}}$  and  $I_{\text{Glut}}$  amplitude. Our work is relevant because it shows for the first time that the synapse-driven currents in the brains of offspring, whose mothers were treated with neuromodulators during the gestation, are affected by the same neuromodulators in a different way as the offspring whose mothers were not treated with such neuromodulators. Moreover, our results could lead to the development of new fields in the study of other currents and experimental models.

Furthermore, studies like this are necessary because they offer evidence that alterations in 5-HT levels during gestation lead to severe pathologies in the neural circuits of the offspring. Such is the case of an autism hypothesis [59]. However, works pointing to this hypothesis have only analyzed it at a behavioral level, not at the level of electrophysiological mechanisms.

## 2. Materials and Methods

All protocols and procedures employed in this study were reviewed and approved by the institutional board of bioethics (VIEP/1944/2016) and followed the national (NOM-062-ZOO-1999) and international guidelines of care and use on experimental animals.

## 2.1. Animals

We used pregnant Sprague–Dawley dams with GD0 to GD8 obtained from the vivarium “Claude Bernard” from the Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Dams were housed individually at a temperature/humidity controlled environment in a 12 h light and dark cycle, with ad libitum access to water and food and were assigned to a group using a double-blind design.

For the first part of this study, we used three groups. The first group (5-MT Pre-Post) follows procedures described for Whitaker–Azmitia [59] in order to reproduce the developmental hyperserotonemia (DHS) model of autism. From GD11 to delivery, pregnant dams received a single daily subcutaneous injection of 1 mg/kg 5-MT (non-selective 5-HT agonist) dissolved in the vehicle (0.85% saline with no more than 0.4% dimethylsulfoxide). After birth, pups were treated with 5-MT at the same dose (1 mg/kg) until weaning (postnatal day 24; PND24), thereupon only the male offspring were kept for further electrophysiological analysis in order to reduce the effects of hormonal-cyclic periods in females. The second group (5-MT Gest) follows the same methodology without the administration of pups after delivery. Finally, mothers from the third group (Control) were injected only with the vehicle as well as the pups.

After the first experiment, only the 5-MT Gest and Control groups were maintained. For this part of the study, only the dams were treated in both the 5-MT Gest and the Control groups.

For each electrophysiological protocol, at least three offspring from no less than two different litters were used.

## 2.2. Reagent

Unless otherwise stated, all reagents purchased were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

## 2.3. Acute-Dissociation Procedure

PFC neurons from young adults (PND40–PND60) were acutely-dissociated using procedures similar to those described previously [60–62]. Dissection of the PFC was limited to V–VI layers, where is the highest density of serotonergic receptors [63].

Slices were maintained between one and six hours at room temperature (20–22 °C) in Earle’s balanced salt solution (EBSS), buffered with sodium bicarbonate (NaHCO<sub>3</sub>), supplemented with 1 mM pyruvic acid, 0.005 mM glutathione, 0.1 mM NG-nitro-L-arginine and 1 mM kynurenic acid, and bubbled with 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>. The pH was adjusted to 7.4 with sodium hydroxide (NaOH), and osmolarity adjusted to 300 mOsm/L.

After at least one hour of incubation, the PFC slices were prepared for enzymatic treatment. Each slice then was placed in a culture chamber containing 40 mL of Hank’s balanced salt solution (HBSS) mixed with 0.75 mg/mL of papain, buffered with 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), bubbled with O<sub>2</sub> and maintained at 35 °C for ten minutes. The solution was supplemented in the same way as the EBSS.

After enzymatic digestion, the tissue was washed with a solution of isethionate and later mechanically separated with various sizes of fire-polished Pasteur pipettes. Suspensions of cells were seeded in 35-mm polystyrene Petri dishes (Corning Inc., Corning, NY, USA) mounted on the recording chamber coupled to an inverted microscope. After ten minutes of incubation, the suspension was washed with a background solution containing 140 mM NaCl, 23 mM glucose, 15 mM HEPES, 2 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub> and 1% phenol red, bubbled with O<sub>2</sub> pH was adjusted to 7.4 with NaOH and osmolarity adjusted to 300 mOsm/L to prepare the tissue for subsequent recording using the voltage-clamp technique.

## 2.4. Whole-Cell Patch-Clamp Technique

Whole-cell voltage-clamp was used to record I<sub>Glut</sub>/I<sub>NMDA</sub> in dissociated pyramidal-neurons from the PFC. Recording electrodes were pulled from borosilicate capillary tubes (1B120F-4, WPI, Sarasota,

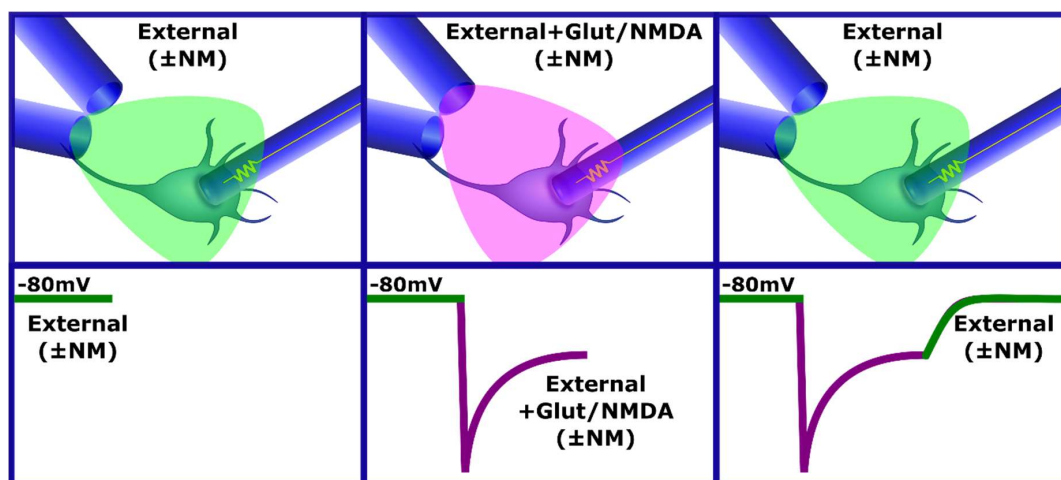
Florida, USA) with a micropipette puller (P-97, Sutter Instruments, CO, USA) and a resistance ranging from 4 to 8 M $\Omega$ .

The internal solution consisted of 175 mM N-methyl-D-glutamine (NMDG), 40 mM HEPES, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM ethylene glycol-bis ( $\beta$ -aminoethyl ether)-N, N, N', N'- tetra acetic acid (EGTA), 12 mM phosphocreatine, 3 mM Na<sub>2</sub>ATP, 0.35 mM Na<sub>3</sub>GTP and 0.1 mM leupeptin, adjusted to a pH of 7.3 with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / NMDG and 265–270 mOsm/L. The external solution consisted of 127 mM NaCl, 20 mM CsCl, 5 mM BaCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 12 mM glucose, and 10 mM HEPES, adjusted to a pH of 7.4 with 300–305 mOsm/L NaOH. Additionally, 10  $\mu$ M glycine was added to the external solution as an NMDA co-agonist for channel activation by glutamate or NMDA [64]. Recordings were obtained with an Axopatch 1-D voltage-clamp amplifier (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), controlled with a pCLAMP version 9 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) and a Digidata 1322A digitizer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Once the seal was broken, only cells with an input resistance ( $R_{IN}$ ) of less than 25 M $\Omega$  were included in the study. The holding potential was set at -80 mV to record  $I_{Glut}$  /  $I_{NMDA}$ . Potassium was blocked by the Cs<sup>+</sup> and Ba<sup>++</sup> present in the external solution.

### 2.5. Drug Application

We induced the  $I_{Glut}$  and  $I_{NMDA}$  currents by applying the compounds using a system of two capillaries placed at 45° to each other and a distance of 300  $\pm$  100  $\mu$ m from the recorded cell. One capillary contained the external solution with or without the tested neuromodulator (External  $\pm$  NM), and the other had External  $\pm$  NM and glutamate or NMDA as required (Figure 1). The solution was changed using solenoid valves (98302-00, Cole-Parmer) controlled by the digital output of the Digidata 1322A system and a control apparatus designed in our laboratory.



**Figure 1.** Application of solutions using capillaries. The application of solutions was controlled using solenoid valves; one capillary contained the external solution with or without the tested neuromodulator (External  $\pm$  NM), and the other had External  $\pm$  NM and Glutamate or N-methyl-D-aspartate (NMDA) as required. In the bottom panels, there are representative traces of the NMDA-current where the effect of the application of each solution is illustrated.

During each protocol, we maintained the potential at -80 mV, and we recorded the activity at a sampling frequency of 403.23 Hz (every 2.48 ms). Each sweep lasted six seconds during which the cell was constantly perfused with the external solution with a three-second interruption during which external solution + glutamate (or NMDA) was applied. This condition was maintained until three or four stable current traces were obtained. This same procedure was then repeated by adding the neuromodulator of interest to the external solution. The condition without the neuromodulators was considered as a reference and washing of the effect of the neuromodulators on the current.

We randomly exposed each cell to different neuromodulators or concentrations used in the assigned electrophysiological protocol in order to balance the time-course and cell-viability-induced changes.

### 2.6. Statistical Analysis

We obtained the neuromodulators effect (5-HT or  $Mg^{++}$ ) as the reduction in the amplitude of the peak or steady-state (SS) of the  $I_{Glut}$  or  $I_{NMDA}$  according to the control and wash conditions. We calculated the percent reduction as follows:

$$\% \text{ Reduction} = \left( 1 - \frac{\delta IL}{((\delta IR + \delta IW)/2)} \right) \times 100 \quad (1)$$

where  $\delta IR$  is the  $I_{Glut}$  or  $I_{NMDA}$  density without the neuromodulator (reference condition),  $\delta IW$  is the  $I_{Glut}$  or  $I_{NMDA}$  density in the wash condition, and  $\delta IL$  is the  $I_{Glut}$  or  $I_{NMDA}$  density in the presence of the neuromodulator tested. We report values as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). We generated curve fits in Origin 9.1 (Microcal Software Inc., North Hampton, MA, USA) and compared with *F*-test in the form:

$$F = \frac{((S_M - (S_C + S_T))/k)}{((S_C + S_T)/(N_C + N_T - 2k))} \quad (2)$$

where  $S_M$  is the residual sum of squares (RSS) for the fit of the combined data of both models,  $S_C$  is the RSS for the fit of the control group,  $S_T$  is the RSS for the fit of the tested group,  $N_C$  and  $N_T$  is the number of observations for the control and the tested group, respectively, and  $k$  is the number of parameters of the fit. This statistic test follows the *F* distribution with  $k$  and  $N_1 + N_2 - 2k$  degrees of freedom. The statistical comparisons were performed with the help of the extension package *drc* [65] for the statistical environment *R* [66].

We performed the data analysis using a Student's *t*-test with Welch's correction or analysis of variance (ANOVA) followed by a multiple comparison test, as appropriate, with the significance set at  $p < 0.05$ .

## 3. Results

We treated a total of 34 pregnant rats for all the experiments presented in this manuscript, 16 with vehicle only and 18 with 5-MT. From these dams, we used 56 pups to obtain a total of 123 cells: 68 belong to the 16 offspring of the control group, 55 cells from the 14 offspring of mothers treated with 5-MT Gest treatment, and 13 cells belong to 4 with 5-MT Pre-Post treatment. The sample only included recorded neurons with a membrane resistance  $\geq 1 \text{ G}\Omega$  and an input resistance  $< 25 \text{ M}\Omega$ . The average of the input resistance for the 123 cells was  $17.66 \text{ M}\Omega$ , with a standard deviation (SD) of  $5.42 \text{ M}\Omega$ .

We determined the cells' size by measuring the cell capacitance and using a capacitance/area ratio of  $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ . The average cell capacitance for the control group was  $19.46$  and  $19.03 \text{ pF}$  for the 5-MT Gest, with an SD of  $4.92$  and  $5.63 \text{ pF}$ , respectively, with no significant difference between groups ( $t_{108.11} = 0.45$ ,  $p = 0.65$ ). We only compared cells of the 5-MT Pre-Post group ( $n = 13$ , average =  $14.55 \text{ pF}$ , SD =  $4.18 \text{ pF}$ ) with those of the control and 5-MT Gest groups used in the same experiment (10 and 12, respectively) because of the small number of cells of this group. No significant difference between the groups was found in this comparison (one way ANOVA  $F_{2,32} = 1.14$ ,  $p = 0.33$ ).

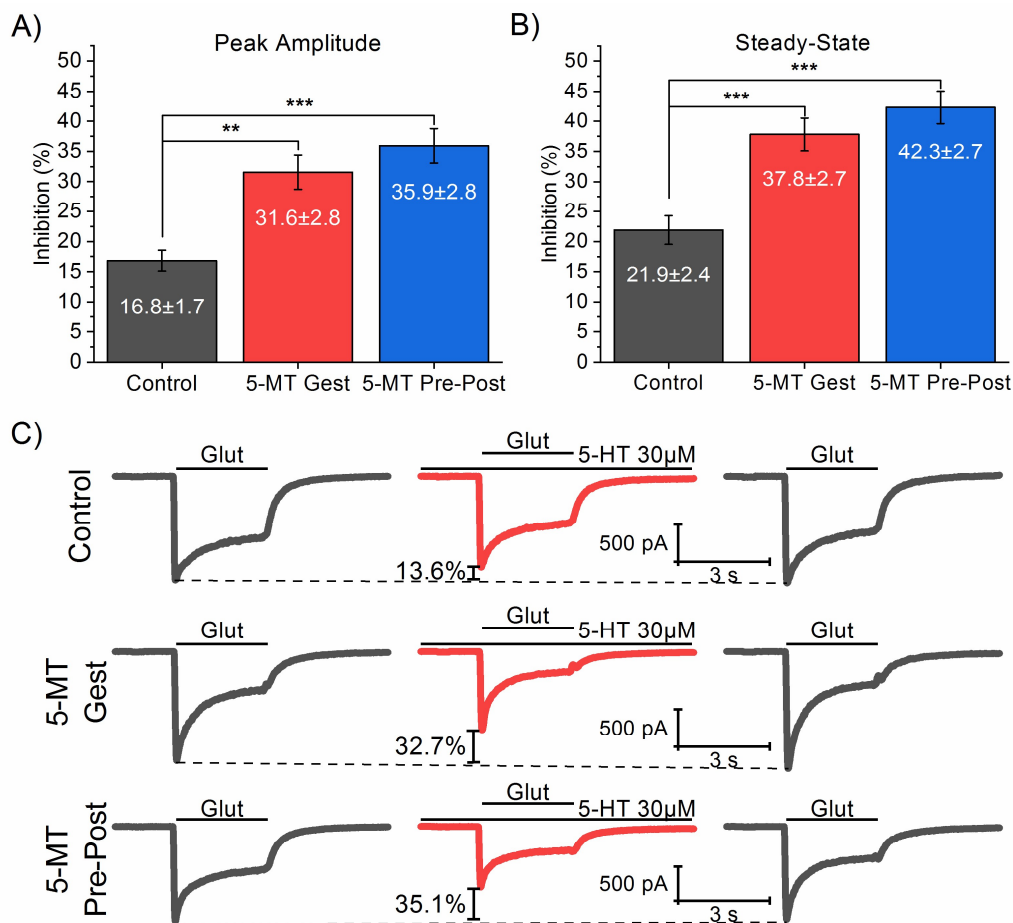
In each experiment, we evaluated cellular viability with a voltage-clamp ramp (from  $-100$  to  $+40 \text{ mV}$ ) lasting  $300 \text{ ms}$  to generate  $\text{Na}^+$  ( $I_{\text{Na}^+} > 1 \text{ nA}$ ) and  $\text{Ca}^{++}$  ( $I_{\text{Ca}^{++}} > 100 \text{ pA}$ ) currents. We excluded any cell with values lower than these from the analysis.

### 3.1. 5-MT Treatment from GD11 to GD21 Increases the 5-HT Effect on $I_{Glut}$

To test the hypothesis that the alteration of 5-HT concentrations of mothers during pregnancy is capable of changing the way 5-HT modulates  $I_{Glut}$  of offspring in a life-lasting way, we examined the serotonergic modulation of  $I_{Glut}$  in acutely dissociated PFC pyramidal neurons of 40 days old offspring

from Sprague–Dawley rats treated with the 5-HT agonist 5-MT from GD11 to GD21 and from GD11 to PND21.

To initiate, we compared a gestational-only treatment (GD11–GD21; “5-MT Gest”;  $n = 10$ ) with the original DHS model (GD11–PND21; “5-MT Pre-Post”;  $n = 13$ ) and a control group ( $n = 12$ ). In particular, we examined whether the 5-MT treatment affects the 5-HT modulation of the  $I_{\text{Glut}}$  and, whether the gestational treatment alone is capable of producing a statistically significant difference from the control. Moreover, we conducted a one-way between-groups ANOVA to compare the effects of treatments on  $I_{\text{Glut}}$  (100  $\mu\text{M}$ ) in the presence of 5-HT (30  $\mu\text{M}$ ). The peak amplitude and SS of  $I_{\text{Glut}}$  were analyzed (Figure 2), finding significant differences of 5-HT effect on both peak amplitude ( $F_{2,32} = 16.18$ ;  $p < 0.001$ ) and SS ( $F_{2,32} = 17.88$ ;  $p < 0.001$ ). Post-hoc comparisons using the Tukey test ( $p < 0.05$ ) indicated that both 5-MT Gest and 5-MT Pre-Post groups are significantly different from the control but no significantly different from each other (Table 1). Altogether, these results suggest that the treatment with 5-MT during an early developmental stage, particularly the period between GD11 and GD21, produces a significant change in the  $I_{\text{Glut}}$  during the presence of 5-HT.



**Figure 2.** Comparison of the effect of different 5-methoxytryptamine (5-MT) administration times on  $I_{\text{Glut}}$  in the presence of serotonin (5-HT). We conducted a one-way between-groups ANOVA to compare the effect on  $I_{\text{Glut}}$  (100  $\mu\text{M}$ ) peak amplitude (A) and SS (B) on the presence of 5-HT (30  $\mu\text{M}$ ) in the groups of treatment 5-MT Gest (GD11–GD21;  $n = 10$ ), 5-MT Pre-Post (GD11–PND21;  $n = 13$ ), and control ( $n = 12$ ). Significant differences were found on both current components (Peak amplitude:  $F_{2,32} = 16.18$ ;  $p < 0.001$ . SS:  $F_{2,32} = 17.88$ ;  $p < 0.001$ ) for both treated groups from the control but not between them. (C) Representative traces of  $I_{\text{Glut}}$  in the presence and absence of 5-HT from pyramidal neurons from each group tested. Significant differences among groups are indicated according to the following significance code:  $p < 0.001$  (\*\*\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.05$  (\*).

**Table 1.** Post-hoc comparisons among groups using the Tukey test ( $p < 0.05$ ).

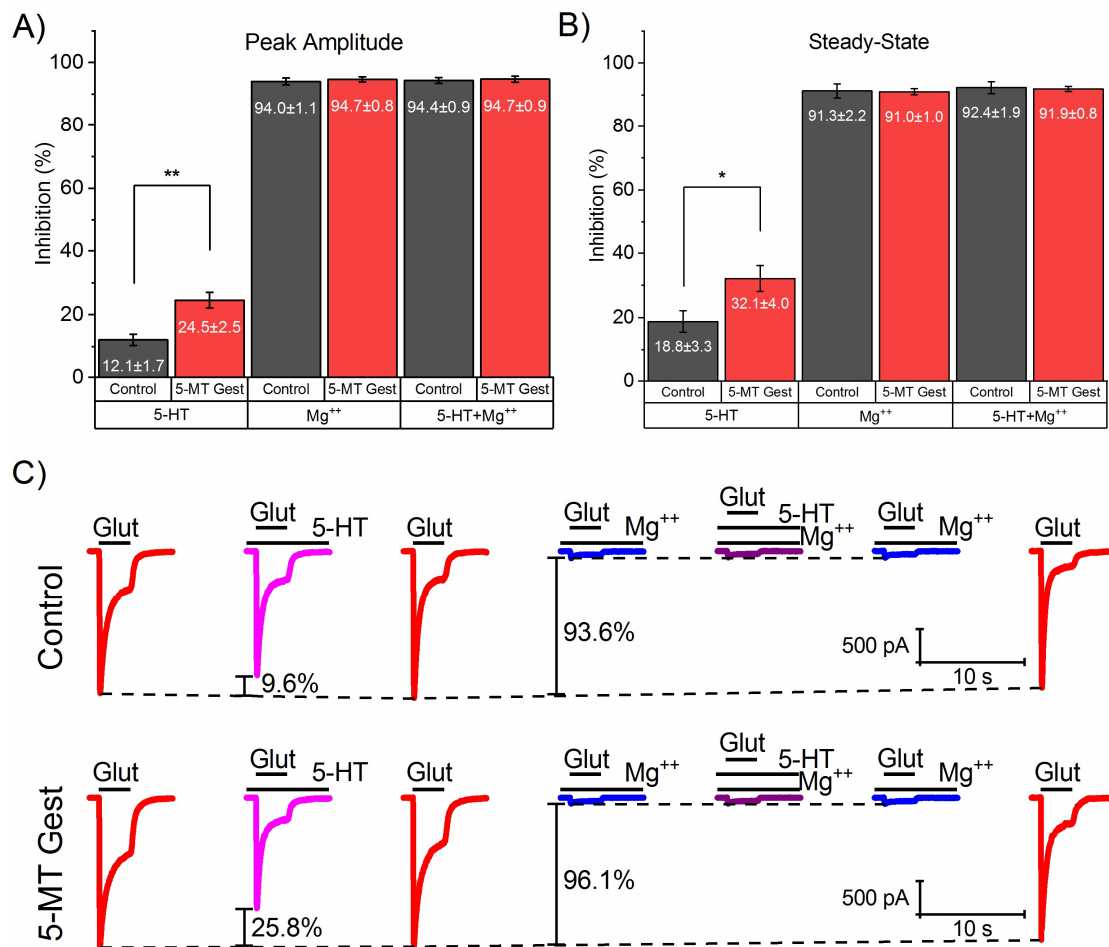
	Peak Amplitude Inhibition (%)				Steady-State Inhibition (%)			
	MeanDiff	SEM	q Value	$p (< q )$	MeanDiff	SEM	q Value	$p (< q )$
<b>5-MT Gest Vs. Control</b>	14.73	3.72	5.6	**	15.91	3.79	5.94	***
<b>5-MT Pre-Post Vs. Control</b>	19.10	3.48	7.77	***	20.41	3.54	8.15	***
<b>5-MT Pre-Post Vs. 5-MT Gest</b>	4.37	3.65	1.69	ns.	4.50	3.72	1.71	ns.

Significance codes:  $p < 0.001$  (\*\*\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.05$  (\*),  $p > 0.05$  (ns.).

### 3.2. 5-HT Reduces the NMDA Receptor-Mediated Component of $I_{Glut}$

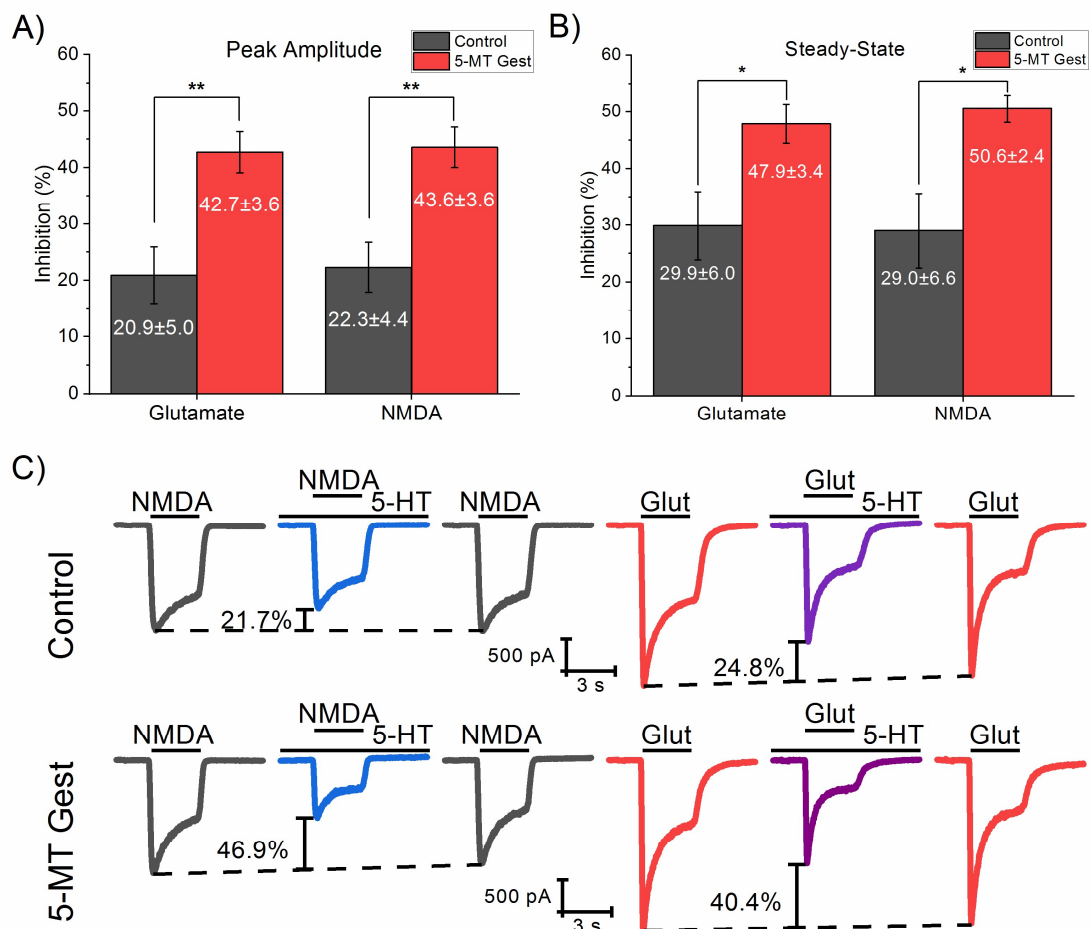
As GD11–GD21 treatment showed no difference from treatment continued up to PND21, we chose to focus on the former to study how altering the mother's serotonergic system at a critical period of offspring development can produce lifelong changes in them. Thus, we analyzed the 5-HT (30  $\mu$ M) effect on both peak amplitude and SS of  $I_{Glut}$  (100  $\mu$ M) for control and 5-MT Gest groups (Control,  $n = 9$ ; 5-MT Gest,  $n = 9$ ). We observed that the peak amplitude shows inhibition of  $12.08 \pm 1.75\%$  in the control group, and  $24.48 \pm 2.46\%$  in those offspring from treated mothers, while the SS was reduced  $18.83 \pm 3.32\%$  and  $32.14 \pm 4.03\%$ , respectively. The difference between groups was significant in both parameters (Peak,  $t_{14.43} = 4.108$ ,  $p = 0.001$ ; SS,  $t_{15.44} = 2.55$ ,  $p = 0.02$ ). During the same protocol, we perfused the cell with  $Mg^{++}$  (1 mM), a known NMDA blocker in order to study the remaining glutamate current and the effect of 5-HT on it. In this way  $Mg^{++}$  alone reduced the peak amplitude by  $94.01 \pm 1.09\%$  for the control group and  $94.68 \pm 0.82\%$  for the treated one, while the SS reduced by  $91.31 \pm 2.22\%$  and  $91.04 \pm 0.97\%$  respectively (Figure 3), showing no significant difference between the groups (Peak,  $t_{14.94} = 0.49$ ,  $p = 0.63$ ; SS,  $t_{10.92} = -0.11$ ,  $p = 0.911$ ). Similarly, when  $Mg^{++}$  was co-applied with 5-HT, neither peak amplitude (Control:  $94.35 \pm 0.92$ ; 5-MT Gest:  $94.74 \pm 0.95$ ) nor SS (Control:  $92.38 \pm 1.87$ ; 5-MT Gest:  $91.95 \pm 0.82$ ) showed significant differences (Peak:  $t_{15.99} = 0.29$ ,  $p = 0.78$ ; SS:  $t_{10.92} = -0.21$ ,  $p = 0.84$ ). It should be noted that no difference was found between the presence and absence of  $Mg^{++}$  for the same group in either peak amplitude (Control:  $t_{15.59} = -0.24$ ,  $p = 0.82$ ; 5-MT Gest:  $t_{15.71} = -0.04$ ,  $p = 0.97$ ) or SS (Control:  $t_{15.56} = -0.36$ ,  $p = 0.72$ ; 5-MT Gest:  $t_{15.56} = -0.72$ ,  $p = 0.48$ ). In summary, the above suggests that treatment with 5-MT causes an increase of up to twice the inhibitory effect of 5-HT over the entire current, mainly affecting the modulation of the NMDA receptor-mediated component of  $I_{Glut}$ .

To verify that the  $I_{Glut}$  component affected by treatment was NMDA receptor-mediated, we compared  $I_{Glut}$  and  $I_{NMDA}$  in the presence of 5-HT in the same cell. 5-MT treatment caused a significant increase of the 5-HT inhibitory effect on the peak amplitude of both  $I_{Glut}$  ( $t_{-3.52} = 7.64$ ,  $p = 0.008$ ) and  $I_{NMDA}$  ( $t_{-3.74} = 8.15$ ,  $p = 0.005$ ) relative to the control group. Similarly, the serotonergic inhibition of SS was increased on both currents by the treatment ( $I_{Glut}$ :  $t_{6.43} = -2.59$ ,  $p = 0.04$ ;  $I_{NMDA}$ :  $t_{5.09} = -3.07$ ,  $p = 0.02$ ). When 5-HT (30  $\mu$ M) was present in the solution,  $I_{Glut}$  (100  $\mu$ M) reduced  $20.88 \pm 5.01\%$  of the peak amplitude and  $29.90 \pm 6.04$  of the SS in the control group, while in the 5-MT Gest group, the reduction was  $42.73 \pm 3.65\%$  and  $47.87 \pm 3.41$ , respectively. Similarly,  $I_{NMDA}$  (100  $\mu$ M) peak amplitude reduced  $22.3 \pm 4.43\%$  in the control group and  $43.58 \pm 3.58\%$  in the treated one, while SS reduced  $29.02 \pm 6.57$  and  $50.56 \pm 2.43$ , respectively, in the presence of 5-HT (Figure 4). Additionally, the inhibition caused by 5-HT in  $I_{Glut}$  and  $I_{NMDA}$  in the same cell exhibits no statistically significant difference between them neither on peak amplitude (Control,  $t_4 = 0.52$ ,  $p = 0.63$ ; 5-MT Gest,  $t_5 = 0.24$ ,  $p = 0.82$ ) or SS (Control  $t_4 = -0.19$ ,  $p = 0.86$ ; 5-MT  $t_5 = 0.7153$ ,  $p = 0.51$ ). That is, the treatment affects the 5-HT modulation of both  $I_{Glut}$  and  $I_{NMDA}$  in the same proportion.



**Figure 3.** Effect of 5-HT (30  $\mu$ M) on both peak amplitude and SS of  $I_{\text{Glut}}$  (100  $\mu$ M) in the presence and absence of  $\text{Mg}^{++}$  (1 mM). Peak amplitude (A) shows a significant difference ( $t_{14.43} = 4.108$ ,  $p = 0.001$ ) between inhibition of  $12.08 \pm 1.75\%$  in the control group ( $n = 9$ ), and  $24.48 \pm 2.46\%$  in those offspring from treated mothers ( $n = 9$ ) when cells were perfused with 5-HT ( $t_{14.43} = 4.108$ ,  $p = 0.001$ ), however, no differences were found between the groups when  $\text{Mg}^{++}$  was applied ( $t_{14.94} = 0.49$ ,  $p = 0.63$ ) nor when  $\text{Mg}^{++}$  and 5-HT were co-applied ( $t_{15.99} = 0.29$ ,  $p = 0.78$ ). Similarly, SS (B) shows difference between groups in the presence of 5-HT (Control:  $18.83 \pm 3.32\%$ ; 5-MT Gest:  $32.14 \pm 4.03\%$ ;  $t_{15.44} = 2.55$ ,  $p = 0.02$ ), but not when it was co-applied with  $\text{Mg}^{++}$  ( $t_{10.92} = -0.21$ ,  $p = 0.84$ ) or in the presence of  $\text{Mg}^{++}$  alone ( $t_{10.92} = -0.11$ ,  $p = 0.91$ ). Also no difference was found between the presence and absence of  $\text{Mg}^{++}$  within the same group in either peak amplitude (Control:  $t_{15.59} = -0.24$ ,  $p = 0.82$ ; 5-MT Gest:  $t_{15.71} = -0.04$ ,  $p = 0.97$ ) or SS (Control:  $t_{15.56} = -0.36$ ,  $p = 0.72$ ; 5-MT Gest:  $t_{15.56} = -0.72$ ,  $p = 0.48$ ). (C) Representative traces of  $I_{\text{Glut}}$  in the presence and absence of 5-HT or  $\text{Mg}^{++}$  and when co-applied. Significance codes:  $p < 0.001$  (\*\*\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.05$  (\*).

Once we identified that the NMDA receptor-mediated current was the  $I_{\text{Glut}}$  component mainly affected by the treatment, we wanted to verify that the observed changes were due to alterations in 5-HT modulation of the current and not in the  $I_{\text{NMDA}}$  itself. To do this, we made an NMDA dose-response curve from 0.3 to 300  $\mu$ M in both groups. We analyzed the peak amplitude and SS of currents from each concentration (Table 2), then fitted data to a logistic curve (Figure 5) and compared them with an  $F$ -test. No significant differences were found between groups on peak ( $F_{4,119} = 1.98$ ,  $p = 0.10$ ) or SS ( $F_{4,119} = 0.99$ ,  $p = 0.42$ ).

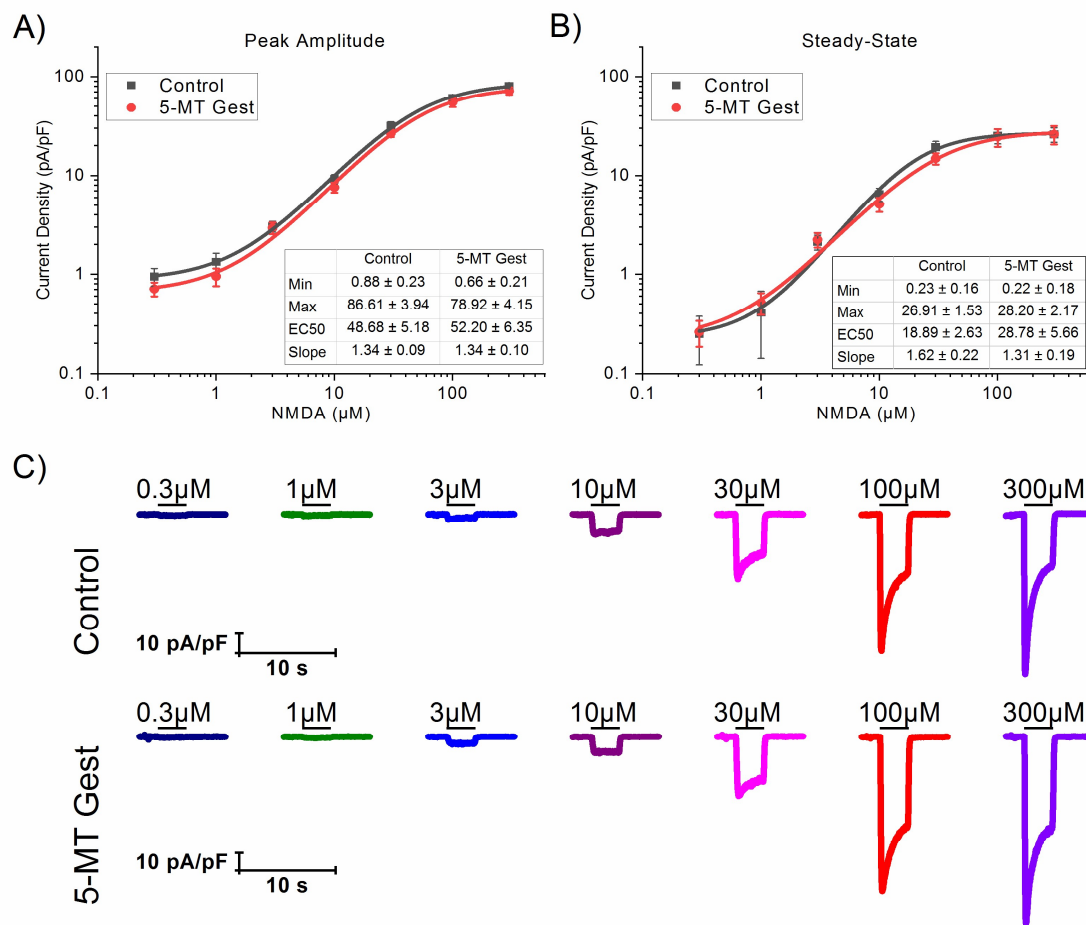


**Figure 4.** Effect of 5-HT (30 $\mu$ M) on  $I_{\text{Glut}}$  and  $I_{\text{NMDA}}$ . The 5-MT treatment caused a significant increase of the 5-HT inhibitory effect of the peak amplitude (A) of both  $I_{\text{Glut}}$  ( $t_{-3.52} = 7.64$ ,  $p = 0.008$ ) and  $I_{\text{NMDA}}$  ( $t_{-3.74} = 8.15$ ,  $p = 0.005$ ) relative to the control group. The SS (B) presents a similar increase in both currents ( $I_{\text{Glut}}$ :  $t_{6.43} = -2.59$ ,  $p = 0.04$ ;  $I_{\text{NMDA}}$ :  $t_{5.09} = -3.07$ ,  $p = 0.02$ ). Conversely, the inhibition caused by 5-HT in  $I_{\text{Glut}}$  and  $I_{\text{NMDA}}$  in the same cell presents no statistically significant difference between them neither on peak amplitude (Control,  $t_4 = 0.52$ ,  $p = 0.63$ ; 5-MT Gest,  $t_5 = 0.24$ ,  $p = 0.82$ ) or SS (Control  $t_4 = -0.19$ ,  $p = 0.86$ ; 5-MT  $t_5 = 0.7153$ ,  $p = 0.51$ ). (C) Representative traces of  $I_{\text{Glut}}$  and  $I_{\text{NMDA}}$  both in the presence and absence of 5-HT in the same cell. Significance codes:  $p < 0.001$  (\*\*\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.05$  (\*).

**Table 2.** Peak amplitude and steady-state of currents from each NMDA concentration.

NMDA( $\mu$ M)	Peak Amplitude (pA/pF)		Steady-State (pA/pF)	
	Control	5-MT Gest	Control	5-MT Gest
0.3	$-0.95 \pm 0.20$ (9)	$-0.71 \pm 0.11$ (7)	$-0.25 \pm 0.13$ (9)	$-0.26 \pm 0.08$ (7)
1	$-1.34 \pm 0.30$ (9)	$-0.95 \pm 0.19$ (9)	$-0.41 \pm 0.27$ (9)	$-0.52 \pm 0.13$ (9)
3	$-3.05 \pm 0.38$ (8)	$-2.95 \pm 0.40$ (9)	$-2.13 \pm 0.37$ (8)	$-2.24 \pm 0.38$ (9)
10	$-9.26 \pm 0.97$ (9)	$-7.61 \pm 0.88$ (9)	$-6.47 \pm 1.00$ (9)	$-5.12 \pm 0.84$ (9)
30	$-31.85 \pm 3.08$ (9)	$-26.74 \pm 2.22$ (9)	$-19.42 \pm 2.76$ (9)	$-14.90 \pm 1.95$ (9)
100	$-61.18 \pm 4.27$ (9)	$-55.34 \pm 6.05$ (9)	$-25.25 \pm 4.36$ (9)	$-24.54 \pm 5.00$ (9)
300	$-80.80 \pm 3.88$ (9)	$-72.21 \pm 6.24$ (9)	$-26.11 \pm 4.35$ (9)	$-26.20 \pm 5.57$ (9)

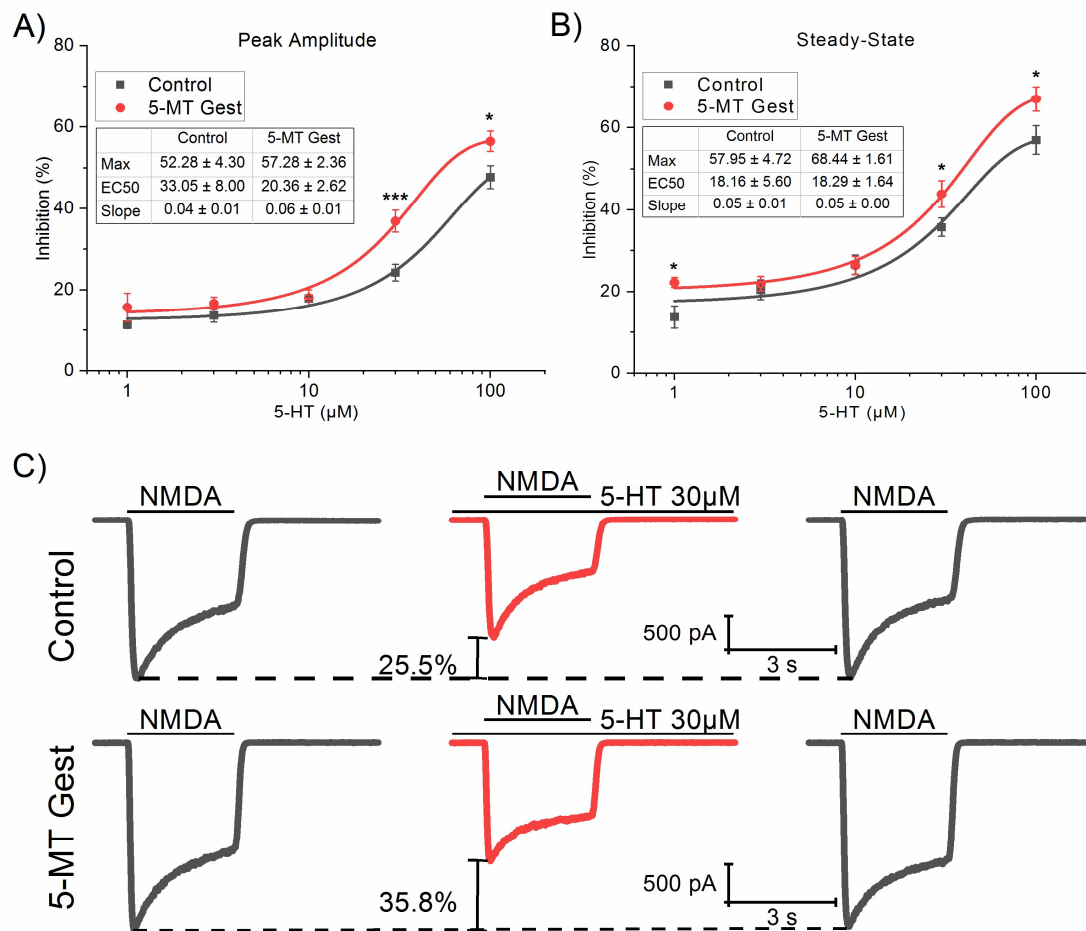
The number of recorded cells for each NMDA concentration and group are displayed between the parentheses.



**Figure 5.** NMDA dose-response curve from 0.3 to 300  $\mu\text{M}$  in both groups. We analyzed the peak amplitude (A) and SS (B) of currents from each concentration, then fitted the data with a logistic function (solid lines) and compared the fitting curves with an F-test. No significant differences were found between groups (peak amplitude:  $F_{4,119} = 1.98$ ,  $p = 0.10$ ; SS:  $F_{4,119} = 0.99$ ,  $p = 0.42$ ). (C) Representative traces of  $I_{NMDA}$  for each tested concentration on both groups.

### 3.3. 5-MT Treatment Increases the Modulatory Effect of 5-HT on $I_{NMDA}$

Subsequently, since we did not find differences between groups in  $I_{NMDA}$ , we made a dose-response curve for the effect of 5-HT (ranged from 1 to 100  $\mu\text{M}$ ) in the  $I_{NMDA}$  (100  $\mu\text{M}$ ). For this curve, we used a total of 54 cells, 33 for the control group, and 21 for the treatment group, each exposed to a maximum of three concentrations of 5-HT administered in random order. The peak amplitude and SS were analyzed (Table 3), fitted to a logistic curve with minimum value fixed to zero (Figure 6), and then compared with an F-test. In this way, we found a statistically significant difference between groups in both peak amplitude ( $F_{3,125} = 10.36$ ,  $p < 0.001$ ) and SS ( $F_{3,125} = 4.23$ ,  $p = 0.007$ ). Also, the difference between groups for each concentration was measured, finding a significant increase of 5-HT inhibition of  $I_{NMDA}$  in treated group related to the control, in 30  $\mu\text{M}$  ( $t_{25.57} = -4.42$ ,  $p < 0.001$ ) and 100  $\mu\text{M}$  ( $t_{23.01} = -2.33$ ,  $p = 0.03$ ) for peak amplitude, and 1  $\mu\text{M}$  ( $t_{15.48} = -2.88$ ,  $p = 0.01$ ), 30  $\mu\text{M}$  ( $t_{26.74} = -2.07$ ,  $p = 0.048$ ), and 100  $\mu\text{M}$  ( $t_{22.14} = -2.18$ ,  $p = 0.04$ ) for SS.



**Figure 6.** Dose-response curve for the effect of 5-HT from 1 to 100  $\mu\text{M}$  in the  $I_{\text{NMDA}}$  (100  $\mu\text{M}$ ). As with the NMDA dose-response, data were analyzed, fitted (solid lines), and compared with an F-test. In this way, we found significant differences between groups in both the peak amplitude (A;  $F_{3,125} = 10.36$ ,  $p < 0.001$ ) and the steady-state (B,  $F_{3,125} = 4.23$ ,  $p = 0.007$ ). Also, the difference between groups for each concentration was measured, finding significance in 30  $\mu\text{M}$  ( $t_{25.57} = -4.42$ ,  $p < 0.001$ ) and 100  $\mu\text{M}$  ( $t_{23.01} = -2.33$ ,  $p = 0.03$ ) for peak amplitude, and 1  $\mu\text{M}$  ( $t_{15.48} = -2.88$ ,  $p = 0.01$ ), 30  $\mu\text{M}$  ( $t_{26.74} = -2.07$ ,  $p = 0.048$ ), and 100  $\mu\text{M}$  ( $t_{22.14} = -2.18$ ,  $p = 0.04$ ) for SS. (C) Representative traces of  $I_{\text{NMDA}}$  in the presence and absence of 5-HT 30  $\mu\text{M}$ . Significance codes:  $p < 0.001$  (\*\*\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.05$  (\*).

**Table 3.** Comparison between groups of the percentage inhibition of the peak amplitude and steady-state of the  $I_{\text{NMDA}}$  for each 5-HT concentration.

5-HT ( $\mu\text{M}$ )	Peak Amplitude Inhibition (%)			Steady-State Inhibition (%)		
	Control	5-MT Gest	$p$ ( $<  t $ )	Control	5-MT Gest	$p$ ( $<  t $ )
1	11.33 ± 0.90 (13)	15.68 ± 3.51 (7)	ns.	13.73 ± 2.69 (13)	22.24 ± 1.22 (7)	*
3	13.64 ± 1.65 (9)	16.63 ± 1.57 (13)	ns.	20.44 ± 2.45 (9)	21.97 ± 1.73 (13)	ns.
10	17.88 ± 0.50 (14)	18.05 ± 1.94 (11)	ns.	26.64 ± 2.33 (14)	26.38 ± 2.23 (11)	ns.
30	24.23 ± 2.06 (16)	36.92 ± 2.69 (16)	***	35.77 ± 2.29 (16)	46.94 ± 3.29 (16)	*
100	47.75 ± 2.81 (12)	56.51 ± 2.48 (14)	*	56.99 ± 3.48 (12)	66.98 ± 2.98 (14)	*

The number of recorded cells for each 5-HT concentration and group are displayed between the parentheses. Significance codes:  $p < 0.001$  (\*\*\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.05$  (\*),  $p > 0.05$  (ns.).

#### 4. Discussion

This study aims to evaluate the effect of 5-HT on  $I_{\text{NMDA}}$  and  $I_{\text{Glut}}$  in dissociated pyramidal neurons of PFC layer V-VI in the offspring of rats treated with a 5-HT agonist during pregnancy. Our data showed that offspring from dams treated with the serotonergic agonist 5-MT (sc. 1 mg/kg/day) from GD11 to

G21 presents significant differences on peak amplitude and SS of  $I_{\text{Glut}}$  in the presence of 5-HT relative to the control group, but did not show differences with treatment continued up to PND21. Observed differences in  $I_{\text{Glut}}$  in the presence of 5-HT are due to an inhibition of the NMDA receptor-activated component of  $I_{\text{Glut}}$ . Nonetheless,  $I_{\text{NMDA}}$  itself is not affected except for its serotonergic modulation. In particular, on the 5-HT dose-response curve, an increase in the inhibitory effect of 5-HT on  $I_{\text{NMDA}}$  was observed, with significant differences of 30 and 100  $\mu\text{M}$  for both peak amplitude and SS.

Our work reaffirms the notion that the effect of 5-HT on PFC pyramidal neurons is mainly inhibitory, and further provides evidence that this inhibitory effect modulates the NMDA-activated component of the  $I_{\text{Glut}}$ . After mimicking a rise in 5-HT concentration with 5-MT, we found an increase of the inhibitory effect of 5-HT, even when the agonist was administered from G11 to birth, or if the treatment was continued until PND21. This increase in the inhibitory effect of 5-HT could lead to a decrease in the excitability of pyramidal neurons in the PFC, similar to what Robello et al. [44] found in the infralimbic cortex, after treatment with a SERT antagonist from PND2 to PND21. Robello et al. [44] found an increase in the excitability of pyramidal neurons from the prelimbic cortex; conversely, we did not find any modulation that could reproduce such a response. The difference in treatment period and layers analyzed could explain the discrepancy between both studies, and it could be due to the different expression and distribution of the 5-HT receptors over time, layers, and subfields of the PFC [24,63].

Animal models using 5-MT to mimic an increase of 5-HT concentration during development have found numerous abnormalities in the serotonergic system [39,67,68], the oxytocinergic cell density [39,69], as well as behavioral [70,71] and morphological changes [43] that have been proposed to be involved in the genesis of multiple neuropsychiatric disorders.

An example of the abnormalities explained above is the autism spectrum, which is the result of an increased 5-HT concentration to which the fetus is exposed during development, a hypothesis described by Whitaker-Azmitia [59] and which provides the basis for the development of her DHS model for autism [59]. However, this hypothesis is based mainly on behavioral evidence [59,70,71]. Therefore, our work examines mechanisms in ionic currents and their modulation, thus supporting this hypothesis. Moreover, our findings shed light on the critical time window and underlying changes involved in this disorder for future study.

Another theory, described by Carlson M.L. [72], postulates that autism could be a hypoglutamatergic disorder; this is based on neuroanatomical and neuroimaging studies indicating alterations in regions rich in glutamatergic neurons, as well as the similarity of symptoms observed in autism and those produced by NMDA antagonists in healthy subjects. In support of this theory, variations of the gene encoding the GluN2B subunit, which does not allow for adequate trafficking and expression to the cell surface, have recently been found in some autistic and schizophrenic patients [73,74]. Concerning this, Yuen et al. [75] demonstrated that activation of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor decreases the traffic and expression of the GluN2B subunit. Therefore, an increase in serotonergic activity, as found in our work, could be contributing through an exacerbation of this mechanism in the development of autism and other disorders.

Altered concentrations of other neurotransmitters, such as dopamine and acetylcholine, have also been associated with the development of disorders such as depression and schizophrenia [76–80]. Therefore, experiments performed with these modulators could provide correlates in the modulation of ionic currents following gestational disturbances, which will be addressed on future work. In this sense, our work is a pioneer in the study of the modulation of ionic currents after variations in the concentration of modulators to which the offspring's brain is exposed during the gestational period.

Our results are consistent with previous studies showing that prenatal exposure to morphine alters the kinetic properties of  $I_{\text{NMDA}}$  currents in the hippocampus of the rat offspring [81]. In this context, it is possible that the prenatal exposure to any drug alters the neuromodulator actions on  $I_{\text{NMDA}}$  and  $I_{\text{Glut}}$ , as well as other ligand-gated channels, in a variety of neurons from the offspring's brain.

## 5. Conclusions

The gestational treatment with a neuromodulator, 5-MT, induces changes in its modulatory function on glutamate currents during adulthood of the offspring. As this increase in modulators, in our case serotonin, can be produced by strong emotional states in certain periods of the gestation this alteration can lead to changes in the way to process information and can be related with pathological psychiatric disorders.

**Author Contributions:** Conceptualization, G.H.-C. and J.F.-H.; methodology, G.H.-C., E.A.R.-L., and G.L.-L.; software, G.H.-C.; validation, G.L.-L.; formal analysis, G.H.-C. and E.A.R.-L.; investigation, G.H.-C. and E.A.R.-L.; resources, J.F.-H.; data curation, G.H.-C., E.A.R.-L., and G.L.-L.; writing—original draft preparation, G.H.-C.; writing—review and editing, E.M. and J.F.-H.; visualization, G.H.-C. and J.F.-H.; supervision, E.M. and J.F.-H.; project administration, J.F.-H.; funding acquisition, J.F.-H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by VIEP (VIEP/1944/2016) and CONACyT (441033) grants to G.H.-C, and from Catedra Marcos Moshisky to E.M.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. *Beyond Neurotransmission: Neuromodulation and Its Importance for Information Processing*, 1st ed.; Katz, P.S., Ed.; Oxford University Press: New York, NY, USA, 1999; ISBN 978-0-19-852424-3.
2. Kupfermann, I. Modulatory actions of neurotransmitters. *Annu. Rev. Neurosci.* **1979**, *2*, 447–465. [[CrossRef](#)]
3. Levitan, I.B. Modulation of ION channels in neurons and other cells. *Annu. Rev. Neurosci.* **1988**, *11*, 119–136. [[CrossRef](#)]
4. Lopez, H.S.; Brown, A.M. Neuromodulation. *Curr. Opin. Neurobiol.* **1992**, *2*, 317–322. [[CrossRef](#)]
5. Marder, E.; Thirumalai, V. Cellular, synaptic and network effects of neuromodulation. *Neural Netw.* **2002**, *15*, 479–493. [[CrossRef](#)]
6. Nadim, F.; Bucher, D. Neuromodulation of neurons and synapses. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2014**, *29*, 48–56. [[CrossRef](#)]
7. Zoli, M.; Agnati, L.F. Wiring and volume transmission in the central nervous system: The concept of closed and open synapses. *Prog. Neurobiol.* **1996**, *49*, 363–380. [[CrossRef](#)]
8. Cassel, J.-C. Experimental studies on the role(s) of serotonin in learning and memory functions. In *Handbook of Behavioral Neuroscience*; Müller, C.P., Jacobs, B.L., Eds.; Handbook of the Behavioral Neurobiology of Serotonin; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2010; Volume 21, pp. 429–447.
9. Duman, E.A.; Canli, T. Social behavior and serotonin. In *Handbook of Behavioral Neuroscience*; Jacobs, C.P.M.B.L., Ed.; Handbook of the Behavioral Neurobiology of Serotonin; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2010; Volume 21, pp. 449–456.
10. Hensler, J.G. Serotonin in mood and emotion. In *Handbook of Behavioral Neuroscience*; Jacobs, C.P.M.B.L., Ed.; Handbook of the Behavioral Neurobiology of Serotonin; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2010; Volume 21, pp. 367–378.
11. Aghajanian, G.K.; Marek, G.J. Serotonin model of schizophrenia: Emerging role of glutamate mechanisms. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **2000**, *31*, 302–312. [[CrossRef](#)]
12. Albert, P.R.; Vahid-Ansari, F.; Luckhart, C. Serotonin-prefrontal cortical circuitry in anxiety and depression phenotypes: Pivotal role of pre- and post-synaptic 5-HT1A receptor expression. *Front. Behav. Neurosci.* **2014**, *8*, 199. [[CrossRef](#)]
13. Eggers, A.E. A serotonin hypothesis of schizophrenia. *Med. Hypotheses* **2013**, *80*, 791–794. [[CrossRef](#)]
14. Lin, S.-H.; Lee, L.-T.; Yang, Y.K. Serotonin and mental disorders: A concise review on molecular neuroimaging evidence. *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.* **2014**, *12*, 196–202. [[CrossRef](#)]
15. Ben-Ari, Y. Neuropaediatric and neuroarchaeology: Understanding development to correct brain disorders. *Acta Paediatr.* **2013**, *102*, 331–334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Frederick, A.L.; Stanwood, G.D. Drugs, biogenic amine targets and the developing brain. *DNE* **2009**, *31*, 7–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

17. Herlenius, E.; Lagercrantz, H. Development of neurotransmitter systems during critical periods. *Exp. Neurol.* **2004**, *190*, 8–21. [[CrossRef](#)]
18. Ruediger, T.; Bolz, J. Neurotransmitters and the development of neuronal circuits. In *Axon Growth and Guidance; Advances in Experimental Medicine and Biology*; Bagnard, D., Ed.; Springer: New York, NY, USA, 2007; pp. 104–114. ISBN 978-0-387-76715-4.
19. Sundström, E.; Kölare, S.; Souverbie, F.; Samuelsson, E.B.; Pschera, H.; Lunell, N.O.; Seiger, A. Neurochemical differentiation of human bulbospinal monoaminergic neurons during the first trimester. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **1993**, *75*, 1–12. [[CrossRef](#)]
20. Lauder, J.M. Ontogeny of the serotonergic system in the rat: Serotonin as a developmental signal. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1990**, *600*, 297–313, discussion 314. [[CrossRef](#)]
21. Rubenstein, J.L. Development of serotonergic neurons and their projections. *Biol. Psychiatry* **1998**, *44*, 145–150. [[CrossRef](#)]
22. Buznikov, G.A.; Lambert, W.H.; Lauder, J.M. Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis. *Cell Tissue Res.* **2001**, *305*, 177–186. [[CrossRef](#)]
23. Bonnin, A.; Goeden, N.; Chen, K.; Wilson, M.L.; King, J.; Shih, J.C.; Blakely, R.D.; Deneris, E.S.; Levitt, P. A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain. *Nature* **2011**, *472*, 347–350. [[CrossRef](#)]
24. Booij, L.; Tremblay, R.E.; Szyf, M.; Benkelfat, C. Genetic and early environmental influences on the serotonin system: Consequences for brain development and risk for psychopathology. *J. Psychiatry Neurosci.* **2015**, *40*, 5–18. [[CrossRef](#)]
25. Brummelte, S.; Mc Glanaghy, E.; Bonnin, A.; Oberlander, T.F. Developmental changes in serotonin signaling: Implications for early brain function, behavior and adaptation. *Neuroscience* **2017**, *342*, 212–231. [[CrossRef](#)]
26. Gaspar, P.; Cases, O.; Maroteaux, L. The developmental role of serotonin: News from mouse molecular genetics. *Nat. Rev. Neurosci.* **2003**, *4*, 1002–1012. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Oberlander, T.F. Fetal serotonin signaling: Setting pathways for early childhood development and behavior. *J. Adolesc. Health* **2012**, *51*, S9–S16. [[CrossRef](#)]
28. Whitaker-Azmitia, P.M. Serotonin and brain development: Role in human developmental diseases. *Brain Res. Bull.* **2001**, *56*, 479–485. [[CrossRef](#)]
29. Shah, R.; Courtiol, E.; Castellanos, F.X.; Teixeira, C.M. Abnormal serotonin levels during perinatal development lead to behavioral deficits in adulthood. *Front. Behav. Neurosci.* **2018**, *12*, 114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Suri, D.; Teixeira, C.M.; Cagliostro, M.K.C.; Mahadevia, D.; Ansorge, M.S. Monoamine-sensitive developmental periods impacting adult emotional and cognitive behaviors. *Neuropsychopharmacology* **2015**, *40*, 88–112. [[CrossRef](#)]
31. Vitalis, T.; Cases, O.; Passemard, S.; Callebert, J.; Parnavelas, J.G. Embryonic depletion of serotonin affects cortical development. *Eur. J. Neurosci.* **2007**, *26*, 331–344. [[CrossRef](#)]
32. González-Burgos, I.; Angel-Meza, A.R.D.; Barajas-López, G.; Feria-Velasco, A. Tryptophan restriction causes long-term plastic changes in corticofrontal pyramidal neurons. *Int. J. Dev. Neurosci.* **1996**, *14*, 673–679. [[CrossRef](#)]
33. Dooley, A.E.; Pappas, I.S.; Parnavelas, J.G. Serotonin promotes the survival of cortical glutamatergic neurons in vitro. *Exp. Neurol.* **1997**, *148*, 205–214. [[CrossRef](#)]
34. Riccio, O.; Potter, G.; Walzer, C.; Vallet, P.; Szabó, G.; Vutskits, L.; Kiss, J.Z.; Dayer, A.G. Excess of serotonin affects embryonic interneuron migration through activation of the serotonin receptor 6. *Mol. Psychiatry* **2009**, *14*, 280–290. [[CrossRef](#)]
35. Riccio, O.; Jacobshagen, M.; Golding, B.; Vutskits, L.; Jabaudon, D.; Hornung, J.P.; Dayer, A.G. Excess of serotonin affects neocortical pyramidal neuron migration. *Transl. Psychiatry* **2011**, *1*, e47. [[CrossRef](#)]
36. Ansorge, M.S.; Morelli, E.; Gingrich, J.A. Inhibition of serotonin but not norepinephrine transport during development produces delayed, persistent perturbations of emotional behaviors in mice. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 199–207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Sprowles, J.L.N.; Hufgard, J.R.; Gutierrez, A.; Bailey, R.A.; Jablonski, S.A.; Williams, M.T.; Vorhees, C.V. Differential effects of perinatal exposure to antidepressants on learning and memory, acoustic startle, anxiety, and open-field activity in Sprague-Dawley rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* **2017**, *61*, 92–111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

38. Lauder, J.M.; Liu, J.; Grayson, D.R. In utero exposure to serotonergic drugs alters neonatal expression of 5-HT(1A) receptor transcripts: A quantitative RT-PCR study. *Int. J. Dev. Neurosci.* **2000**, *18*, 171–176. [[CrossRef](#)]
39. Madden, A.M.K.; Zup, S.L. Effects of developmental hyperserotonemia on juvenile play behavior, oxytocin and serotonin receptor expression in the hypothalamus are age and sex dependent. *Physiol. Behav.* **2014**, *128*, 260–269. [[CrossRef](#)]
40. Blažević, S.; Hranilović, D. Expression of 5HT-related genes after perinatal treatment with 5HT agonists. *Transl. Neurosci.* **2013**, *4*, 165–171. [[CrossRef](#)]
41. Cases, O.; Vitalis, T.; Seif, I.; Maeyer, E.D.; Sotelo, C.; Gaspar, P. Lack of barrels in the somatosensory cortex of monoamine oxidase A-deficient mice: Role of a serotonin excess during the critical period. *Neuron* **1996**, *16*, 297–307. [[CrossRef](#)]
42. Vitalis, T.; Cases, O.; Callebert, J.; Launay, J.-M.; Price, D.J.; Seif, I.; Gaspar, P. Effects of monoamine oxidase A inhibition on barrel formation in the mouse somatosensory cortex: Determination of a sensitive developmental period. *J. Comp. Neurol.* **1998**, *393*, 169–184. [[CrossRef](#)]
43. Janušonis, S.; Gluncic, V.; Rakic, P. Early serotonergic projections to Cajal-Retzius cells: Relevance for cortical development. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 1652–1659. [[CrossRef](#)]
44. Rebello, T.J.; Yu, Q.; Goodfellow, N.M.; Cagliostro, M.K.C.; Teissier, A.; Morelli, E.; Demireva, E.Y.; Chemiakine, A.; Rosoklija, G.B.; Dwork, A.J.; et al. Postnatal day 2 to 11 constitutes a 5-HT-sensitive period impacting adult mPFC function. *J. Neurosci.* **2014**, *34*, 12379–12393. [[CrossRef](#)]
45. Fuster, J.M. *The Prefrontal Cortex*, 4th ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2008; ISBN 978-0-12-373644-4.
46. Catts, V.S.; Fung, S.J.; Long, L.E.; Joshi, D.; Vercammen, A.; Allen, K.M.; Fillman, S.G.; Moore, L.; Rothmond, D.; Sinclair, D.; et al. Rethinking schizophrenia in the context of normal neurodevelopment. *Front. Cell. Neurosci.* **2013**, *7*, 60. [[CrossRef](#)]
47. Ghoshal, A.; Conn, P.J. The hippocampo-prefrontal pathway: A possible therapeutic target for negative and cognitive symptoms of schizophrenia. *Futur. Neurol.* **2015**, *10*, 115–128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Deserno, L.; Sterzer, P.; Wüstenberg, T.; Heinz, A.; Schlagenhauf, F. Reduced prefrontal-parietal effective connectivity and working memory deficits in schizophrenia. *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 12–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Garcia, L.P.; Witteveen, J.S.; Middelman, A.; van Hulten, J.A.; Martens, G.J.M.; Homberg, J.R.; Kolk, S.M. Perturbed developmental serotonin signaling affects prefrontal catecholaminergic innervation and cortical integrity. *Mol. Neurobiol.* **2019**, *56*, 1405–1420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Brumback, A.C.; Ellwood, I.T.; Kjaerby, C.; Iafrati, J.; Robinson, S.; Lee, A.T.; Patel, T.; Nagaraj, S.; Davatolhagh, F.; Sohal, V.S. Identifying specific prefrontal neurons that contribute to autism-associated abnormalities in physiology and social behavior. *Mol. Psychiatry* **2018**, *23*, 2078–2089. [[CrossRef](#)]
51. Willsey, A.J.; Sanders, S.J.; Li, M.; Dong, S.; Tebbenkamp, A.T.; Muhle, R.A.; Reilly, S.K.; Lin, L.; Fertuzinhos, S.; Miller, J.A.; et al. Coexpression networks implicate human midfetal deep cortical Projection neurons in the pathogenesis of autism. *Cell* **2013**, *155*, 997–1007. [[CrossRef](#)]
52. Goeden, N.; Velasquez, J.; Arnold, K.A.; Chan, Y.; Lund, B.T.; Anderson, G.M.; Bonnin, A. Maternal inflammation disrupts fetal neurodevelopment via increased placental output of serotonin to the fetal brain. *J. Neurosci.* **2016**, *36*, 6041–6049. [[CrossRef](#)]
53. Peters, D.A. Prenatal stress increases the behavioral response to serotonin agonists and alters open field behavior in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1986**, *25*, 873–877. [[CrossRef](#)]
54. Peters, D.A. Maternal stress increases fetal brain and neonatal cerebral cortex 5-hydroxytryptamine synthesis in rats: A possible mechanism by which stress influences brain development. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1990**, *35*, 943–947. [[CrossRef](#)]
55. St-Pierre, J.; Laurent, L.; King, S.; Vaillancourt, C. Effects of prenatal maternal stress on serotonin and fetal development. *Placenta* **2016**, *48*, S66–S71. [[CrossRef](#)]
56. Lattimore, K.A.; Donn, S.M.; Kaciroti, N.; Kemper, A.R.; Neal, C.R.; Vazquez, D.M. Selective Serotonin Reuptake Inhibitor (SSRI) use during pregnancy and effects on the fetus and newborn: A meta-analysis. *J. Perinatol.* **2005**, *25*, 595–604. [[CrossRef](#)]
57. Olivier, J.D.; Åkerud, H.; Kaihola, H.; Pawluski, J.L.; Skalkidou, A.; Högberg, U.; Sundström Poromaa, I. The effects of maternal depression and maternal selective serotonin reuptake inhibitor exposure on offspring. *Front. Cell. Neurosci.* **2013**, *7*, 73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

58. Velasquez, J.C.; Goeden, N.; Bonnin, A. Placental serotonin: Implications for the developmental effects of SSRIs and maternal depression. *Front. Cell. Neurosci.* **2013**, *7*, 47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Whitaker-Azmitia, P.M. Behavioral and cellular consequences of increasing serotonergic activity during brain development: A role in autism? *Int. J. Dev. Neurosci.* **2005**, *23*, 75–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Bargas, J.; Howe, A.; Eberwine, J.; Cao, Y.; Surmeier, D.J. Cellular and molecular characterization of Ca<sup>2+</sup> currents in acutely isolated, adult rat neostriatal neurons. *J. Neurosci.* **1994**, *14*, 6667–6686. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Flores-Hernández, J.; Cepeda, C.; Hernández-Echeagaray, E.; Calvert, C.R.; Jokel, E.S.; Fienberg, A.A.; Greengard, P.; Levine, M.S. Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized striatal neurons: Role of D1 receptors and DARPP-32. *J. Neurophysiol.* **2002**, *88*, 3010–3020. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Flores-Hernández, J.; Hernandez, S.; Snyder, G.L.; Yan, Z.; Fienberg, A.A.; Moss, S.J.; Greengard, P.; Surmeier, D.J. D(1) dopamine receptor activation reduces GABA(A) receptor currents in neostriatal neurons through a PKA/DARPP-32/PP1 signaling cascade. *J. Neurophysiol.* **2000**, *83*, 2996–3004. [[CrossRef](#)]
63. Santana, N.; Artigas, F. Laminar and cellular distribution of monoamine receptors in rat medial prefrontal cortex. *Front. Neuroanat.* **2017**, *11*, 87. [[CrossRef](#)]
64. Parsons, C.G.; Danysz, W.; Hesselink, M.; Hartmann, S.; Lorenz, B.; Wollenburg, C.; Quack, G. Modulation of NMDA receptors by glycine — introduction to some basic aspects and recent developments. *Amino Acids* **1998**, *14*, 207–216. [[CrossRef](#)]
65. Ritz, C.; Baty, F.; Streibig, J.C.; Gerhard, D. Dose-response analysis using R. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0146021. [[CrossRef](#)]
66. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2019.
67. Shemer, A.V.; Azmitia, E.C.; Whitaker-Azmitia, P.M. Dose-related effects of prenatal 5-methoxytryptamine (5-MT) on development of serotonin terminal density and behavior. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **1991**, *59*, 59–63. [[CrossRef](#)]
68. Whitaker-Azmitia, P.M.; Azmitia, E.C. Autoregulation of fetal serotonergic neuronal development: Role of high affinity serotonin receptors. *Neurosci. Lett.* **1986**, *67*, 307–312.
69. Martin, M.M.; Liu, Y.; Wang, Z. Developmental exposure to a serotonin agonist produces subsequent behavioral and neurochemical changes in the adult male prairie vole. *Physiol. Behav.* **2012**, *105*, 529–535.
70. Kahne, D.; Tudorica, A.; Borella, A.; Shapiro, L.; Johnstone, F.; Huang, W.; Whitaker-Azmitia, P.M. Behavioral and magnetic resonance spectroscopic studies in the rat hyperserotonemic model of autism. *Physiol. Behav.* **2002**, *75*, 403–410.
71. McNamara, I.M.; Borella, A.W.; Bialowas, L.A.; Whitaker-Azmitia, P.M. Further studies in the developmental hyperserotonemia model (DHS) of autism: Social, behavioral and peptide changes. *Brain Res.* **2008**, *1189*, 203–214.
72. Carlsson, M.L. Hypothesis: Is infantile autism a hypoglutamatergic disorder? Relevance of glutamate – serotonin interactions for pharmacotherapy. *J. Neural Transm.* **1998**, *105*, 525–535.
73. Sceniak, M.P.; Fedder, K.N.; Wang, Q.; Droubi, S.; Babcock, K.; Patwardhan, S.; Wright-Zornes, J.; Pham, L.; Sabo, S.L. An autism-associated mutation in GluN2B prevents NMDA receptor trafficking and interferes with dendrite growth. *J. Cell Sci.* **2019**, *132*, jcs232892. [[PubMed](#)]
74. Liu, S.; Zhou, L.; Yuan, H.; Vieira, M.; Sanz-Clemente, A.; Badger, J.D.; Lu, W.; Traynelis, S.F.; Roche, K.W. A rare variant identified within the GluN2B C-terminus in a patient with autism affects NMDA receptor surface expression and spine density. *J. Neurosci.* **2017**, *37*, 4093–4102. [[PubMed](#)]
75. Yuen, E.Y.; Jiang, Q.; Chen, P.; Gu, Z.; Feng, J.; Yan, Z. Serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptors regulate NMDA receptor channels through a microtubule-dependent mechanism. *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 5488–5501. [[PubMed](#)]
76. Field, T.; Diego, M.; Hernandez-Reif, M.; Figueiredo, B.; Deeds, O.; Ascencio, A.; Schanberg, S.; Kuhn, C. Prenatal dopamine and neonatal behavior and biochemistry. *Infant Behav. Dev.* **2008**, *31*, 590–593. [[PubMed](#)]
77. McCarthy, D.; Lueras, P.; Bhide, P.G. Elevated dopamine levels during gestation produce region-specific decreases in neurogenesis and subtle deficits in neuronal numbers. *Brain Res.* **2007**, *1182*, 11–25.
78. Money, K.M.; Stanwood, G.D. Developmental origins of brain disorders: Roles for dopamine. *Front. Cell. Neurosci.* **2013**, *7*, 260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

79. Laplante, F.; Nakagawasai, O.; Srivastava, L.K.; Quirion, R. Alterations in behavioral responses to a cholinergic agonist in post-pubertal rats with neonatal ventral hippocampal lesions: Relationship to changes in muscarinic receptor levels. *Neuropsychopharmacol* **2005**, *30*, 1076–1087. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Freedman, R.; Ross, R.G. Prenatal choline and the development of schizophrenia. *Shanghai Arch. Psychiatry* **2015**, *27*, 90–102. [[PubMed](#)]
81. Yang, S.N.; Yang, J.-M.; Wu, J.-N.; Kao, Y.-H.; Hsieh, W.-Y.; Chao, C.C.; Tao, P.-L. Prenatal exposure to morphine alters kinetic properties of NMDA receptor-mediated synaptic currents in the hippocampus of rat offspring. *Hippocampus* **2000**, *10*, 654–662. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## **Striatal Neurodegeneration that Mimics Huntington's Disease Modifies GABA-induced Currents**

**Autores:**

Jorge Flores-Hernández, Jeanette A. Garzón-Vázquez, Gustavo Hernández-Carballo, Elizabeth Nieto-Mendoza, Evelyn A. Ruíz-Luna and Elizabeth Hernández-Echeagaray

**Publicado:** 6 December 2018 en Brain Sciences (<https://www.mdpi.com/2076-3425/8/12/217>)

## **Comparación de la sertralina y del extracto metanólico de *Psilocybe Cubensis* sobre la calidad espermática en un modelo de depresión inducido por estrés temprano en ratas**


**Autores:**

C. Galicia-Ramírez, E. Ruíz-Luna, A. Rodríguez-Rubí, G. Hernández-Carballo, U. Quiroz-López, R. Reyes-Luna, and J. Flores-Hernández

**Publicado:** 19 March 2020 en Suplemento de la Revista Mexicana de Física (<https://rmf.smf.mx/ojs/rmf-s/article/view/4894/4930>)

Article

# Striatal Neurodegeneration that Mimics Huntington's Disease Modifies GABA-induced Currents

Jorge Flores-Hernández<sup>1</sup>, Jeanette A. Garzón-Vázquez<sup>1</sup>, Gustavo Hernández-Carballo<sup>1</sup>, Elizabeth Nieto-Mendoza<sup>2</sup>, Evelyn A. Ruíz-Luna<sup>1</sup> and Elizabeth Hernández-Echeagaray<sup>2,\*</sup> 

<sup>1</sup> Instituto de Fisiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla C.P.72570, México; jlvflores@hotmail.com (J.F.-H.); jeanettegarzon@gmail.com (J.A.G.-V.); l.gustavoh.carballo@gmail.com (G.H.-C.); evy\_0927@hotmail.com (E.A.R.-L.)

<sup>2</sup> Laboratorio de neurofisiología del desarrollo y la neurodegeneración, UBIMED, FES-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México, FES-Iztacala, Av. de Los Barrios #1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla C.P.54090, México; elynieto@gmail.com

\* Correspondence: aehe67@gmail.com or elihernandez@unam.mx; Tel.: +52-55-5623-1333 (ext. 39787)

Received: 23 October 2018; Accepted: 4 December 2018; Published: 6 December 2018



**Abstract:** Huntington's Disease (HD) is a degenerative disease which produces cognitive and motor disturbances. Treatment with GABAergic agonists improves the behavior and activity of mitochondrial complexes in rodents treated with 3-nitropropionic acid to mimic HD symptomatology. Apparently, GABA receptors activity may protect striatal medium spiny neurons (MSNs) from excitotoxic damage. This study evaluates whether mitochondrial inhibition with 3-NP that mimics the early stages of HD, modifies the kinetics and pharmacology of GABA receptors in patch clamp recorded dissociated MSNs cells. The results show that MSNs from mice treated with 3-NP exhibited differences in GABA-induced dose-response currents and pharmacological responses that suggests the presence of GABA<sub>C</sub> receptors in MSNs. Furthermore, there was a reduction in the effect of the GABA<sub>C</sub> antagonist that demonstrates a lessening of this GABA receptor subtype activity as a result of mitochondria inhibition.

**Keywords:** 3-NP; mitochondria; HD; gaboxadol; 2-AEMP; GABA<sub>C</sub>.

## 1. Introduction

Huntington's Disease (HD) is a genetic neurodegenerative disorder originated by a gene mutation which results in the degeneration of neurons mainly in the nucleus striatum. The underlying mechanisms of degeneration are not fully understood, but experimental evidence suggests that the bioenergetics' deficit produced by mitochondrial dysfunction and oxidative stress can be a significant factor in the development and progression of HD [1–4]. Indeed, the systemic administration of toxins or mitochondrial inhibitors, such as 3-nitropropionic acid (3-NP), produces movement disorders in primates and rodents [5–9] and cell damage that resembles the neuropathology observed in patients affected by HD [10–12]. This effect occurs because GABAergic striatal projection neurons (medium spiny neurons, MSNs) are particularly vulnerable to mitochondrial dysfunction and excitotoxicity [1,13]. For example, 3-NP in a concentration that produces 10% of inhibition of the succinate dehydrogenase (SDH) is capable of promoting the mitochondria permeability transition pore and stimulates Ca<sup>2+</sup> increase, that in concert with the stimulation of glutamate receptors induces neuronal death of striatal MSNs [14,15]. The study of the physiological mechanisms responsible for the major vulnerability of MSNs may add to the development of therapeutic strategies, capable of lessening or stopping the neurodegenerative process and clinical manifestations. No cure for HD has been developed thus far; treatments are directed to attenuate symptomatology.

GABAergic transmission is one of the main objectives to develop treatments to reduce excitability increase at the striatum of HD patients, because GABA release produces phasic and tonic inhibition at the MSNs. Phasic inhibition is given by receptors located at the postsynaptic sites which are low sensitivity receptors, while tonic inhibition is given by high affinity receptors normally located at extra synaptic sites. GABA<sub>A</sub> tonic mediated currents have been related with cellular protection in excitotoxicity. Therefore, tonic GABAergic inhibition has been proposed as a target for therapeutic management in HD [16–18].

Our group has demonstrated that 3-NP treatment can imitate early stages of HD [19] and alters GABAergic synapses and plasticity [20]. Also, the treatment with GABAergic agonists improves the behavior and activity of mitochondrial complexes in rodents treated with 3-NP, suggesting that GABAergic agonists exert a neuroprotective effect in instances of mitochondrial damage [21]. Additionally, GABAergic receptors undergo conformational changes that appear to protect MSNs from damage due to excitotoxicity [17]. To further the understanding of GABA receptors alterations in the early stages of HD, the objective of this study was to evaluate whether mitochondrial inhibition that mimics the early stages of HD modifies the kinetics of GABA-induced currents and pharmacology of GABAergic receptors in MSNs.

## 2. Material and Methods

All protocols and procedures employed in this study were reviewed and approved by the institutional board of bioethics (VIEP-2013-3557) and followed the national (NOM-062-ZOO-1999) and international guidelines of care and use on experimental animals.

### 2.1. Animals

Male C57BL/6 strain, 30-day-old mice were obtained from Harlan, Inc., México or ENVIGO RMS, México. The mice were housed in Plexiglas boxes at room temperature (24–26 °C) under a 12:12 h light/dark cycle with free access to food and water, and assigned to a group treated with 3-NP (15 mg/kg, diluted in phosphate buffer (0.1 M PB, pH 7.4, dissolved in 1 mL/20 g), i.p. over 5 days) or to a control group that only received the pharmaceutical excipient (0.1 M PB, pH 7.4, 1 mL/20 g) in an equal amount. 2 days after last treatment injection, the electrophysiological recordings were carried out [19].

### 2.2. Reagents

Unless otherwise stated all reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

### 2.3. Slice Preparation

Tissue slicing and separation were performed according to previously described methods [22,23]. Dissection of the striatum was limited to the region that was rostral and dorsal to the anterior commissure to reduce contamination by the globus pallidus.

Slices were maintained between 1 and 6 hours at room temperature (20–22 °C) in Earle's balanced salt solution (EBSS), buffered with sodium bicarbonate (NaHCO<sub>3</sub>), supplemented with 1 mM pyruvic acid, 0.005 mM glutathione, 0.1 mM N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine and 1 mM kynurenic acid, and bubbled with 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>. The pH was adjusted to 7.4 with NaOH and osmolarity adjusted to 300 mOsm/L.

After at least 1 hour of incubation, slices from the striate nucleus were prepared for enzymatic treatment. Each slice was placed in a culture chamber containing 40 mL of Hank's balanced salt solution (HBSS) mixed with 0.2 mg papain (Calbiochem, San Diego CA, USA), buffered with 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), bubbled with O<sub>2</sub> and maintained at 35 °C for 10 min. The solution was supplemented in the same way as the EBSS.

Subsequent to enzymatic digestion, the tissue was washed with a solution of isethionate and later mechanically separated with various sizes of flame-polished Pasteur pipettes. Suspensions of cells were seeded in 35-mm polystyrene Petri dishes (Nunclon Surface, NUNC, Rochester, NY, USA)

mounted on the recording chamber coupled to a microscope. After 10 min of incubation, the suspension was washed with a solution containing 140 mM NaCl, 23 mM glucose, 15 mM HEPES, 2 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub> and 1% phenol red, bubbled with O<sub>2</sub> pH was adjusted to 7.4 with NaOH and osmolarity adjusted to 300 mOsm/L to prepare the tissue for subsequent recording using the voltage-clamp technique.

#### 2.4. Whole-Cell Patch-Clamp Technique

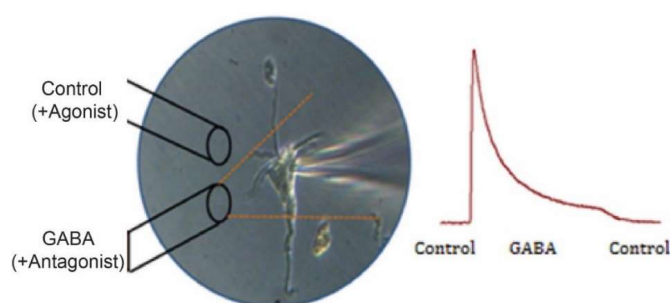
Whole-cell voltage-clamp was used to record GABA-induced currents in neurons of the striate nucleus. Recording electrodes were pulled from borosilicate capillary tubes (1B120F-4, WPI, Sarasota, Florida, USA) with a micropipette puller (P-97, Sutter Instruments, CO, USA) and a resistance ranging from 4 to 8 MΩ.

The internal solution consisted of 175 mM N-methyl-D-glutamine (NMDG), 40 mM HEPES, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM ethylene glycol-bis (β-aminoethyl ether)-N, N, N', N'- tetra acetic acid (EGTA), 12 mM phosphocreatine, 3 mM Na<sub>2</sub>ATP, 0.35 mM Na<sub>3</sub>GTP and 0.1 mM leupeptin, adjusted to a pH of 7.3 with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / NMDG and 265–270 mOsm/L. The external solution consisted of 127 mM NaCl, 20 mM CsCl, 5 mM BaCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 12 mM glucose and 10 mM HEPES, adjusted to a pH of 7.4 with 300–305 mOsm/L NaOH and was supplemented as appropriate with GABAergic agents. Recordings were obtained with a Multiclamp 700A voltage clamp amplifier (Molecular Devices, Foster City, CA), controlled with pCLAMP version 8 (Molecular Devices, Foster City, CA) run on a Pentium (IV, 3.20 GHz) computer with a Digidata 1322A interface (Molecular Devices, Foster City, CA).

Once the seal was broken, only cells with an input resistance ( $R_{IN}$ ) less than 25 MΩ were included in the study. To record GABA-induced currents the holding potential was set at 0 mV, allowing access to the chlorine-based GABA-activated current, whose equilibrium potential is about −80 mV. Additionally, maintaining the membrane continuously at 0 mV inactivates sodium and calcium currents. Potassium was blocked by the Cs<sup>+</sup> and Ba<sup>2+</sup> present in the external solution.

#### 2.5. Drug Application

GABA-activated currents ( $I_{GABA}$ ) were induced by applying the compound using a system of capillaries placed at 45° with respect to each other and at a distance of 200 to 600 μm from the recorded cell. One capillary contained the external solution alone (control), and the other had the external solution and 1 of 2 ligands (Figure 1). The solution was changed using solenoid valves (The Lee Company, Essex CO LFAA 1201718H) controlled by the output of the Digidata 1322A system (Molecular Devices, Foster City, CA) and a control apparatus designed in our laboratory. The ligands used were 4, 5, 6, 7-tetrahydroisoxazolo (5,4-c) pyridin-3-ol (THIP, Gaboxadol), which is an agonist of GABA<sub>A</sub> receptors that contain the δ subunit but an antagonist of GABA<sub>C</sub> receptors, the negative allosteric modulator L-655,708 (TOCRIS Bioscience, Bristol, UK) an inverse agonist of GABA<sub>A</sub> receptors containing the α<sub>5</sub> subunit, as well as the GABA<sub>C</sub> antagonist 2-Aminoethyl methylphosphonate (2-AEMP, this compound was a gift from Dr. Lobo, University of Maryland, USA).



**Figure 1.** Application of solutions using capillaries. The application of solutions was controlled using solenoid valves; on the right of the photo, there is a representative trace of the current generated by the GABA application.

## 2.6. Electrophysiology Protocols

**Application of GABA:** With a membrane holding potential of 0 mV, GABA was applied for 5 s; the entire protocol lasted 90 s.

**Recovery protocol:** This protocol was used to study the time constant for the recovery of the current to 100% after the initial application. A test pulse was delivered, followed by a quiet period increased in steps of 5 s, at which point a second pulse was delivered. The interval between the initial pulses was 90 s. Each pulse used a holding potential of 0 mV.

**Current versus voltage (IV) protocol:** Square voltage pulses were applied in steps of 20 mV to achieve a holding potential of  $-80$  mV. During the pulse, GABA was applied for 5 s. The protocol lasted for 90 s.

**Control condition:** The cell was continuously perfused with the external solution using capillary 1 for the duration of the protocol, which was interrupted for 5 s to bathe the cell with 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 or 1000  $\mu\text{M}$  GABA through capillary 2. This experimental condition was used as the control and for the wash out to eliminate the effect of the application of the GABA antagonists.

**GABA + antagonist condition:** The bath was maintained with the external solution and interrupted with a cell bath with a solution for the co-application of GABA and Gaboxadol, GABA and L-655,708, or GABA and 2-AEMP.

## 2.7. Statistical Analysis

The antagonistic effect was measured as the reduction in the amplitude of the peak of the  $I_{\text{GABA}}$  with respect to the control and wash conditions. The percent reduction was calculated as follows:

$$\% \text{ reduction} = ((\delta I_{\text{NE}} / ((\delta I_{\text{C}} + \delta I_{\text{L}}) / 2)) - 1) * 100$$

where  $\delta I_{\text{C}}$  is the GABA induced current density in the control condition,  $\delta I_{\text{L}}$  is the GABA induced current density in the wash condition, and  $\delta I_{\text{NE}}$  is the GABA induced current density in the presence of the GABA antagonist. Values are reported as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Curve fits and graphs were generated in Origin 9.1 (Microcal Software Inc., North Hampton, MA). Data analysis was performed using analysis of variance (ANOVA) followed by a multiple comparison test with the significance set at  $p < 0.05$ .

## 3. Results

A total of 173 cells were recorded: 150 MSNs and 23 giant interneurons. Half of the MSNs belonged to the control group and half to the group from mice treated with 3-NP. Only recorded neurons with a membrane resistance  $\geq 1$  G $\Omega$  and an input resistance  $< 25$  M $\Omega$  were included in the sample.

The size of the cells was determined by measuring the cell capacitance and using a capacitance/area ratio of 1  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ . 95% and 98% of the neural population were MSNs whose capacitance ranged from 3 to 6 pF (Figure S1). There was no difference in the measured capacitance in the cells of the 2 groups (Figure S1).

In each experiment, cellular viability was evaluated with a voltage ramp (from  $-100$  mV to  $+40$  mV) lasting 300 ms to generate  $\text{Na}^+$  ( $I_{\text{Na}^+} < 1$  nA) and  $\text{Ca}^{2+}$  ( $I_{\text{Ca}^{2+}} < 100$  pA) currents. Cells with values lower than these were excluded from analysis.

### 3.1. Recording $I_{\text{GABA}}$

#### Equilibrium Potential for $I_{\text{GABA}}$

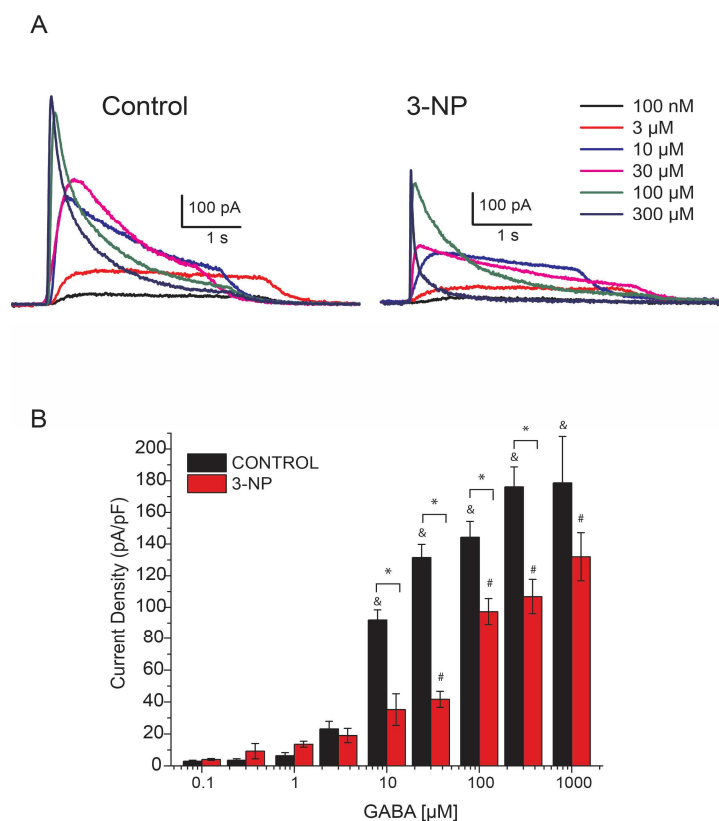
The current versus voltage (IV) protocol was used to generate the  $I_{\text{GABA}}$  (100  $\mu\text{M}$ ) at different voltages (Figure S2A,B). To determine the equilibrium potential for  $I_{\text{GABA}}$ , a second-order polynomial was fit to the peak current-voltage data (Figure S2C,D). The equilibrium potential was almost the same

for both experimental groups, but the peak current and current density was greater for the control group than for the 3-NP group evaluated at 0 mV but these differences were not statistically significant.

### 3.2. GABA-Activated Currents ( $I_{GABA}$ )

Given the changes in membrane capacitance,  $I_{GABA}$  was normalized to obtain the peak current density as pA/pF.  $I_{GABA}$  was evoked using different concentrations of GABA (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 and 1000  $\mu$ M); the resulting plots of current density as a function of GABA concentration are shown in Figure 2A.

The peak density of  $I_{GABA}$  in neurons of animals from the 3-NP group was compared with that of the control group (Figure 2B).



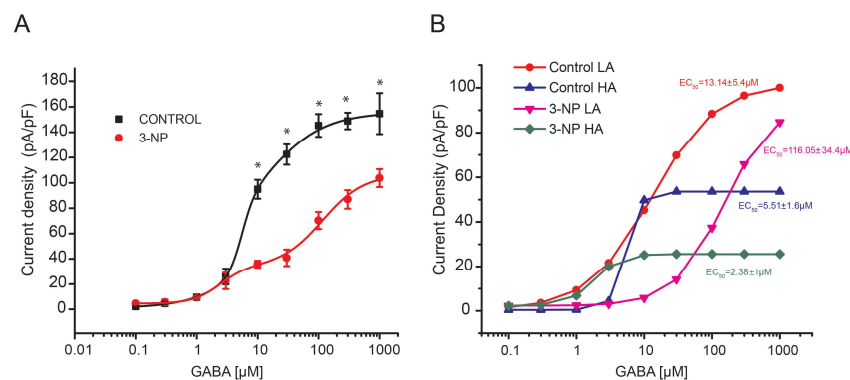
**Figure 2.** Dose-dependent response of GABA-activated current. (A) Representative traces of the activated current for 0.1, 3, 10, 30, 100, and 300  $\mu$ M GABA from the MSNs of control and 3-NP mice. (B) Concentration dependent response to GABA is expressed as current density. The response to 10, 30, 100, and 300  $\mu$ M of GABA was statistically different between control and 3-NP groups ( $F_{1, 94} = 6.39$ ,  $p < 0.01$ , two way ANOVA), the GABA induced current amplitude increased significantly in both groups by rising the concentration of GABA from 10  $\mu$ M for control group and from 30  $\mu$ M for 3-NP groups ( $F_{8, 94} = 26.02$ ,  $p < 0.05$ , two way ANOVA). Significant differences among GABA concentration are indicated with (&) for control group and with (#) for 3-NP groups and with a (\*) for differences between 3-NP and control groups. Control group (black), 3-NP group (red). &, #, \*  $p < 0.05$ .

### GABA Dose-Response Curve in Medium Spiny Neurons

Pharmacological effects on a population of receptors can be reflected in dose-response curves. To determine the  $EC_{50}$  for GABA, a double-logistic dose-response curve was generated, resulting in 2  $EC_{50}$  values for each group. In the control group,  $EC_{50}$  1 was  $13.14 \pm 5.4$   $\mu$ M and  $EC_{50}$  2 was  $5.51 \pm 1.6$ ; in the 3-NP group,  $EC_{50}$  1 was  $116.05 \pm 34.4$   $\mu$ M and  $EC_{50}$  2 was  $2.38 \pm 1.0$  (Figure 3B). These results suggest the existence of more than 1 population of receptors with different pharmacological sensitivities, where the effects of the same compound on the different populations

are added. The 2 populations with different  $EC_{50}$  values are observed in the dose-response curves as different phases associated with each sigmoidal component.

Knowing the parameters for the pharmacological activities for each population with respect to the same compound, it is possible to separate 1 population from the other. We developed algorithms to differentiate the distinct parameters of the summed sigmoidal functions in Origin. This procedure is called “peeling of sigmoidal functions” and helps to distinguish the population of receptors with a low affinity for GABA (LA) from the population with a high affinity (HA) in the 2 experimental groups (Figure 3B). The  $EC_{50}$  of the population with high affinity to GABA was not different between the 3-NP and control groups, but a difference was found in the low-affinity populations between the 2 experimental groups (Figure 3B).



**Figure 3.** GABA dose-response curves. (A) GABA dependent concentrations response to 0.1  $\mu$ M ( $n = 12$ ), 0.3  $\mu$ M ( $n = 10$ ), 1  $\mu$ M ( $n = 10$ ), 3  $\mu$ M ( $n = 12$ ), 10  $\mu$ M ( $n = 12$ ), 30  $\mu$ M ( $n = 12$ ), 100  $\mu$ M ( $n = 15$ ), 300  $\mu$ M ( $n = 15$ ) and 1000  $\mu$ M ( $n = 15$ ) in both experimental groups \*  $p < 0.01$ . (B) Peeling of sigmoidal functions plots to identify 2 different populations in the control group (LA  $EC_{50} = 13.14 \pm 5.478$ , and HA  $EC_{50} = 5.51 \pm 1.695$ ,  $F_{7,2} = 1195.24$ ,  $p = 0.0001$ , double logistic regression) and in the 3-NP group (LA  $EC_{50} = 116.05 \pm 34.4$  and HA  $EC_{50} = 2.38 \pm 1.09$ ,  $F_{7,2} = 248.69$ ,  $p = 0.004$ , double logistic regression).

### 3.3. GABA Dose-Response Curves in Giant Interneurons

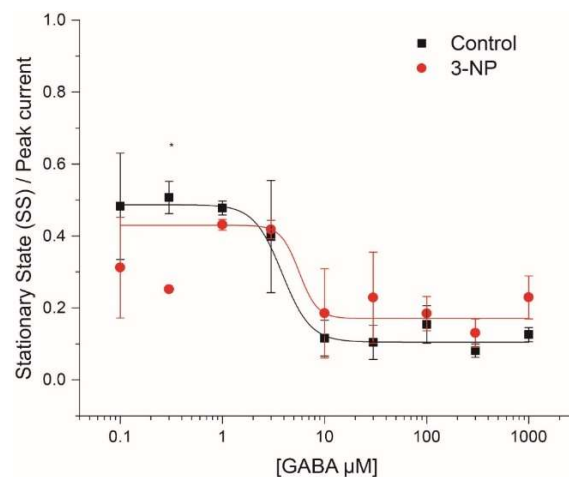
Recordings from cholinergic interneurons did not show differences in the current density versus GABA concentration used between the 2 experimental groups (Figure S3). These results demonstrate that cholinergic interneurons are not affected by mitochondrial inhibition of this model of HD.

### 3.4. Kinetics of the $I_{GABA}$

The following parameters were analyzed to study the kinetics of GABA<sub>A</sub> receptors: steady state/peak current, time to peak and time constant ( $\tau$ ) of desensitization.

#### 3.4.1. Steady-State (SS)/Peak Current

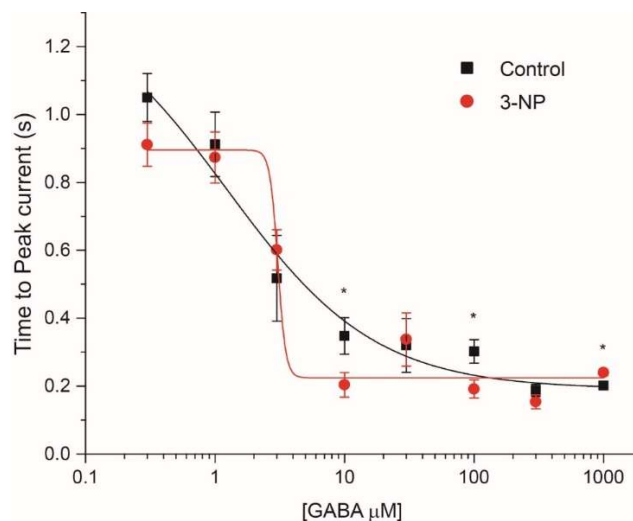
The steady-state to peak current ratio ranges between 0 and 1, as shown in Figure 4. From the dose-response curve, the steady state/peak current ratio shows that at low GABA concentrations (<10  $\mu$ M), currents generated present a desensitization of approximately 50%, while at higher doses (>10  $\mu$ M), the desensitization is approximately 95%. But the groups did not present statistical differences.



**Figure 4.** Steady-state versus peak GABA-activated current. The SS/peak parameter was used as a measure of GABA receptor desensitization for concentrations of 0.1  $\mu\text{M}$ , 0.3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$  and 1000  $\mu\text{M}$  in MSNs of both evaluated groups. Data Analysis showed differences in 0.3  $\mu\text{M}$  GABA concentration but no between groups or in the interaction ( $F_{8, 17} = 5.53$ ,  $p < 0.001$ , Two way ANOVA).

#### 3.4.2. Time to Peak

The time to peak was used as a measure of the activation time of  $I_{\text{GABA}}$ . The values obtained at GABA concentrations of 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  and 1000  $\mu\text{M}$  were significantly faster than those obtained with 0.1  $\mu\text{M}$ , 0.3  $\mu\text{M}$ , and 3  $\mu\text{M}$  of GABA but we did not find significant differences between the control and the 3-NP groups except for 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  and 1000  $\mu\text{M}$  (Figure 5).



**Figure 5.** Time to peak of the GABA current. The activation time of  $I_{\text{GABA}}$  was different only for GABA concentrations of 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , and 1000  $\mu\text{M}$  ( $F_{7, 15} = 69.36$ ,  $p < 0.05$ , Two ways ANOVA). \*  $p < 0.05$ .

#### 3.4.3. Time Constant of Desensitization ( $\tau$ )

The speed and desensitization of the  $\text{GABA}_A$  receptor depend on the composition of the subunits. In our experiments we only identified significant differences in the values of  $\tau$  between experimental groups for the GABA concentration of 0.1  $\mu\text{M}$  (Table 1).

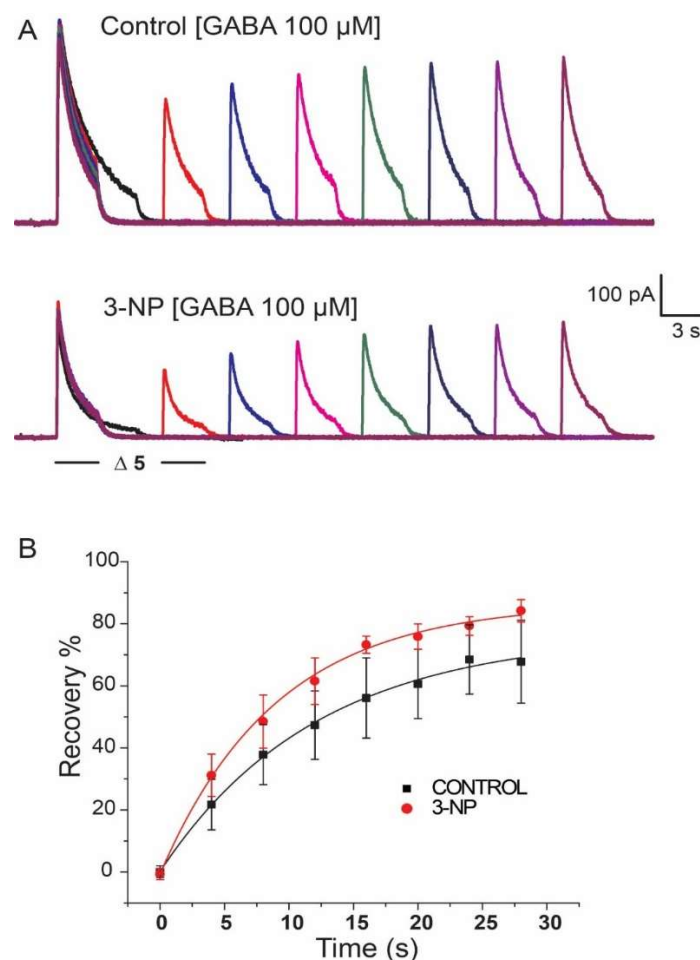
**Table 1.** Time constant of desensitization.

GABA $\mu\text{M}$	Control		3-NP	
	$\tau$ ms	SE	$\tau$ ms	SE
0.1	975.73	$\pm 254.90$	391.70	* $\pm 47.44$
0.3	674.24	$\pm 133.83$	444.63	$\pm 52.48$
1	539.43	$\pm 133.35$	565.41	$\pm 72.35$
3	1056.66	$\pm 503.34$	1035.37	$\pm 366.46$
10	874.02	$\pm 321.01$	713.63	$\pm 236.11$
30	851.91	$\pm 206.72$	601.76	$\pm 170.57$
100	957.68	$\pm 115.54$	903.12	$\pm 104.11$
300	468.44	$\pm 63.53$	766.92	$\pm 144.60$
1000	761.81	$\pm 330.15$	1133.05	$\pm 148.23$

Table displays desensitization time constants for each GABA concentration in the experimental groups \*  $p < 0.001$ .

### 3.5. Recovery of $I_{\text{GABA}}$

The recovery protocol described in the methodology section was used to evaluate both experimental groups. Figure 6A illustrates traces obtained for the control and 3-NP groups. The percentage of recovery of the current was plotted versus time and was fit to a first-order decaying exponential, yielding values similar for the control group and for the 3-NP group (Figure 6B).

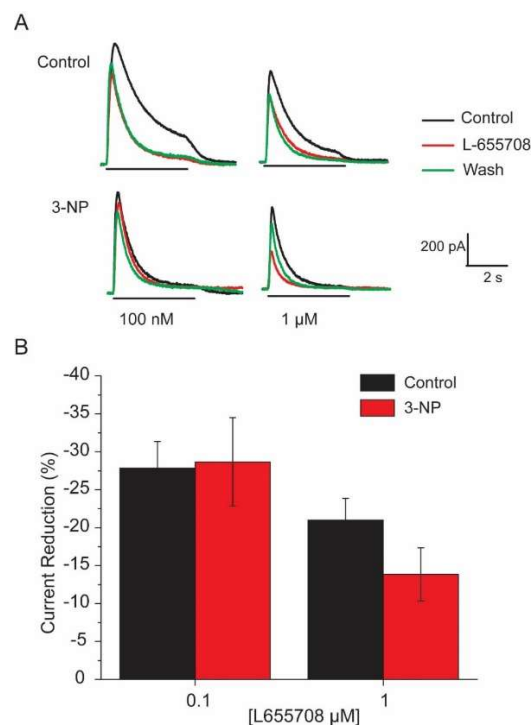


**Figure 6.** Recovery of  $I_{\text{GABA}}$ . (A) Representative plot of the GABA (100  $\mu\text{M}$ ) recovery protocol for a control group neuron and for a 3-NP group neuron. (B) Plot of the percentage of current recovery versus time for the application of 100  $\mu\text{M}$  GABA. Recovery time for the control group was similar for the recovery time for the 3-NP group.

Given the characteristics observed in the  $I_{GABA}$  dose-response, we questioned the role of high-affinity and low-desensitization receptors in MSNs of our HD animal model. GABA extra synaptic receptors are known to be high affinity receptors which are sensitive to ischemic alterations and may change in degenerative disorders, and then we decided to evaluate GABA receptors with the  $\alpha 5$  and  $\delta$  subunits.

### 3.6. Effects of the $\alpha 5$ Subunit Inverse Agonist L-655708

The percent reduction in  $I_{GABA}$  induced by 100  $\mu M$  GABA was determined in the MSNs in the presence of 3, 10, 30, 100 and 1000 nM L-655708, a GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha 5$  subunit inverse agonist (Figure 7). The dose-response analysis of the GABA current density in the presence of L-655708 resulted in an  $EC_{50}$  of  $119.11 \pm 52.8$  for the control group and  $EC_{50}$  of  $95.85 \pm 43.02$   $\mu M$  for the 3-NP group. Figure 7A shows representative traces of the effect of L-655708 100nM and 1  $\mu M$  on the GABA<sub>A</sub> receptors in control and in the 3-NP group. Figure 7B shows plots of the current density of the experiments with the L-655708. Note that no significant differences were found in the percent reduction of the current due to the co-application of L-655708 and 100  $\mu M$  GABA between the 2 groups. These results demonstrate that GABA receptors with the  $\alpha 5$  subunit are not altered as a result of the damage produced by mitochondria inhibition.



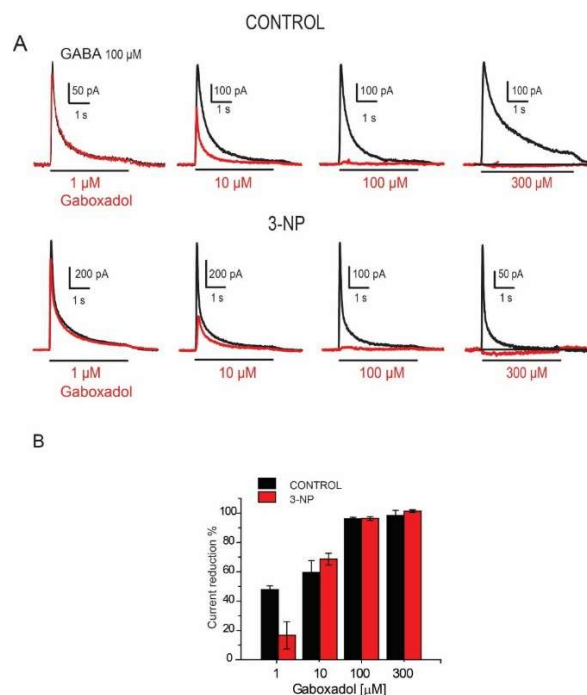
**Figure 7.** L-655708 effects on GABA induced current. (A) Representative traces of the current generated by GABA in the presence of 100 nM and 1  $\mu M$  L-655708 in the MSNs of the control and 3-NP groups. (B) Plot of the GABA induced current reduction in the presence of two different concentrations of L-655708.

### 3.7. Effects of the Gaboxadol

The effects of Gaboxadol, an agonist of GABA<sub>A</sub> receptors with  $\delta$  subunits and an antagonist of GABA<sub>C</sub> receptors, was evaluated in the presence of 100  $\mu M$  GABA. Figure 8A shows representative traces of these effects. Surprisingly, we observed a concentration-dependent reduction in  $I_{GABA}$  in both evaluated groups instead of the expected increase.

The percent reduction in current in the MSNs was analyzed at 1, 10, 100 and 300  $\mu M$  of Gaboxadol giving an  $EC_{50} = 15.67 \pm 1.968$  for control neurons and  $EC_{50} = 9.81 \pm 3.562$  for neurons of the 3-NP

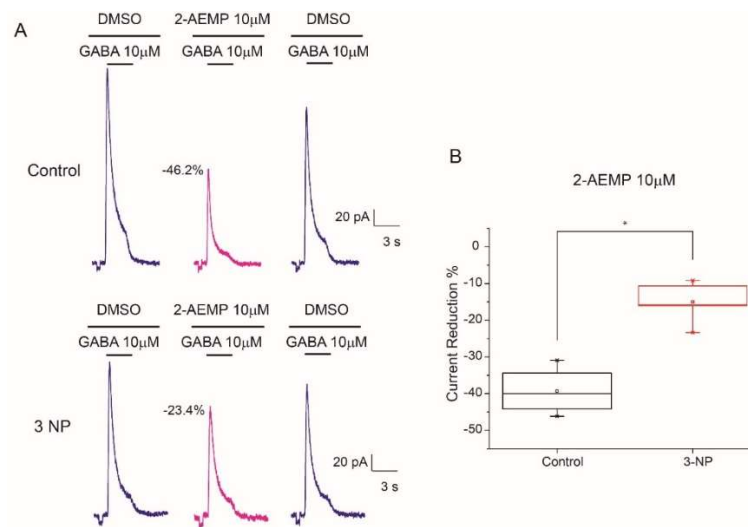
group. The statistical analysis did not show significant differences between neurons in the control group versus those in the 3-NP group (Figure 8B).



**Figure 8.** Gaboxadol effect on GABA induced current. (A) Representative traces of the GABA induced current (100 μM) with a co-application of Gaboxadol in 1 μM, 10 μM, 100 μM, 300 μM in both experimental groups. (B) Plot of the GABA induced current reduction recorded from the MSNs using increasing concentrations of Gaboxadol in control and 3-NP groups.

### 3.8. GABA<sub>C</sub> Receptors Reduction in 3-NP Group

Pharmacological inhibition of GABA induced currents by Gaboxadol suggested the presence of GABA<sub>C</sub> receptors, since the Gaboxadol may act on GABA<sub>C</sub> and GABA<sub>A</sub> receptors we opted for the specific evaluation of GABA<sub>C</sub> function in striatal MSNs. To do that evaluation, we used the 2-Aminoethyl methylphosphonate trifluoroacetate salt (2-AEMP) a competitive GABA<sub>C</sub> antagonist. To see the effect of the 2-AEMP on high affinity GABA receptors we used a GABA concentration of 10 μM as reported by other studies [24]. 2-AEMP reduced I<sub>GABA</sub> peak current in neurons of both; control and 3-NP-treated mice (Figure 9A); however, the reduction in the 3-NP group was significantly smaller (−15.03 % ± 2.49) than in the control group (−39.29 % ± 2.49), suggesting that GABA<sub>C</sub> receptors are reduced as a result of mitochondrial inhibition (Figure 9B).



**Figure 9.** 2-AEMP effect on GABA induced current. (A) Representative traces of the GABA induced current (10 μM) with a co-application of 2-AEMP (10 μM) in Control (top) and 3-NP groups (bottom). GABA administration was co-applied with DMSO used as an excipient for 2-AEMP. (B) Box plots illustrating the current peak reduction of  $I_{GABA}$  induced by the  $GABA_C$  antagonist. MSNs from the 3-NP group were significantly less inhibited by the 2-AEMP compared to control neurons ( $t_7 = -6.015$ ,  $p < 0.001$ ).

#### 4. Discussion

The aim of this study was to evaluate whether mitochondrial inhibition that mimics early stages of HD modifies the kinetics of GABA-induced currents and pharmacology of GABAergic receptors in MSNs.

Our data showed that cells from the mice treated with 3-NP exhibited a reduction in the GABA gated peak current in concentrations of 10, 30, 100, 300 and 1000 μM. High affinity receptors did not show significant differences in the peeling of sigmoidal functions analysis. Differences were observed in the high affinity receptors as observed with concentrations higher to 10 μM of GABA. No changes were observed in the stationary state and in the time to peak in most of the evaluated concentrations. The recovery of GABA current neither exhibited significant changes between groups.

We tested an antagonist (L655708) and agonist (Gaboxadol) of GABA receptors containing the  $\alpha 5$  subunit which has been implicated in GABA transmission neuroprotection. The exploration of high affinity receptors with the  $\alpha 5$  antagonist L-655708 did not present differences between groups and exhibited a small reduction of the  $I_{GABA}$  amplitude. The evaluation of Gaboxadol did not present an increase in the  $I_{GABA}$  amplitude. On the contrary, a reduction in the  $I_{GABA}$  amplitude was observed in a dose concentration mode. The effect of Gaboxadol on  $GABA_A$  receptors varies depending on GABA subunit composition. It is a partial agonist of GABA receptors with  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$  and full agonist GABA receptors with  $\alpha 5$  subunit, however is an antagonist of  $GABA_C$  receptors containing the  $\rho 1$  subunit [25–28]. To verify the presence of  $GABA_C$  in dissociated MSNs and evaluate the role of those receptors, some experiments were carried out with the competitive  $GABA_C$  antagonist 2-AEMP, this compound reduced GABA gated current in less proportion than it did in control cells, demonstrating that these receptors were reduced as a result of mitochondria inhibition.

##### 4.1. MSN Capacitance Decreases as a Result of 3-NP

The recorded neurons were identified by their morphologies, capacitances and input resistances. The capacitance of the MSNs did not significantly decrease in the group treated with 3-NP. Although the reduction in capacitance in dissociated cells is less evident than in recordings from cells in slice preparations. Our lab has demonstrated that the MSNs of mice treated with 3-NP in same concentration

of this study, have a smaller number of spines and narrower dendrites [29]. These changes reduce the capacitance, a result also found in other animal models of HD [30,31].

#### 4.2. Recording $I_{GABA}$

The equilibrium potential for GABA was the same between the 2 groups, as well as the recovery time of the response to 100  $\mu$ M GABA. Interestingly, the current density was greater for neurons treated with 3-NP at the lowest GABA concentration (0.1 to 1  $\mu$ M), indicating that GABA high affinity receptors increased in these group of cells, probably as compensatory response in the early stages of striatal neurodegeneration [17].

Analysis of the dose-response curve in the MSNs showed the presence of at least 2 populations of GABAergic receptors exhibiting different affinities for and efficacies in response to GABA. MSNs treated with 3-NP showed a change in  $EC_{50}$  of a population of receptors with low affinity, suggesting that mitochondrial inhibition modifies the expression and/or composition of the subunits of the GABA<sub>A</sub> receptor. There is experimental evidence of changes in the subunits of GABA receptors in a number of neuropathologies and in hypoxic events [32].

Administration of GABA at low concentrations (<10  $\mu$ M) resulted in little desensitization in the control group and 3-NP group. At higher concentrations (>10  $\mu$ M), both groups showed a desensitization of 95% of the current with no significant differences between the groups.

The activation time was not different between groups. Analysis of the kinetics revealed one-time constants of desensitization ( $\tau_1$ ) that was not significantly different for all GABA concentrations. Both, the speed and degree of desensitization depend on the subunit composition and they may change [33–35]. However, the lack of kinetics differences in our experimental groups was due to the fact that our animal model mimics early stages of HD and GABA responses are not damaged as they may be in advanced stages of the illness.

The giant interneurons did not show any changes due to treatment with 3-NP, neither in their capacitance nor in the kinetics of the GABA current, similar to the behavior of neurons in HD-transgenic mice [36,37]. It is not known how interneurons remain the same despite the observed changes in the spiny projection neurons in advanced stages of the illness in HD patients and animal models.

#### 4.3. Effect of L-655708

We evaluated whether high affinity GABA receptors containing  $\alpha_5$  subunit, that have been involved in neuroprotection were present in the MSNs. Our data showed that they are present but did not show significant differences in the reduction percentage of the GABA current when 100mM of GABA was co-applied to at different concentrations of the specific antagonist L-655708 [38], suggesting that expression of the  $\alpha_5$  subunit of the GABA<sub>A</sub> receptor is not altered by treatment with 3-NP, as it happened in the R6/1 mouse model of HD at 6 months [18].

Because the experiments were performed in the soma of the dissociated MSNs, we cannot rule out the possibility of a change in the expression of the receptors in the dendrites. L-655708 is 50-100 times more selective for the GABA<sub>A</sub> receptors containing the  $\alpha_5$  subunit than for those that contain  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  and  $\alpha_6$  and they are located mainly at extrasynaptic sites [39].

#### 4.4. Effect of Gaboxadol

Gaboxadol is a partial agonist of GABA<sub>A</sub> receptors that express the  $\alpha_4$  and  $\delta$  subunits full agonist of GABA receptors containing the  $\alpha_5$  [25,26,40]; but it acts as an antagonist of GABA<sub>C</sub> receptors which contain rho subunits [27]. We did not observe any agonistic effect of Gaboxadol when recording from the soma of dissociated MSNs. Gaboxadol acted as an antagonist to the  $I_{GABA}$  in both the control cells and those from animals in the 3-NP group, indicating that this effect could occur through actions on the GABA<sub>C</sub> receptors of the MSNs; these receptors are in the striatum [41], and may be able to form heteromers with GABA<sub>A</sub> in the striatum as occurs in other regions [42,43]. Still our results were unexpected, because in MSNs GABA<sub>A</sub> mainly have been described [22,23]. The experiments with

the 2-AEMP were conclusive to demonstrate that GABA<sub>C</sub> are in MSNs and they are reduced in 3-NP tissue. Indeed, a reduction in GABA $\rho$ 3 subunit has also been documented in the R6/2 transgenic mice model of HD [44], supporting that GABA<sub>C</sub> receptors are affected in HD pathology.

GABA<sub>C</sub> receptors have high affinity and slow desensitization to GABA and may mediate GABA responses to low GABA concentrations. They are thought to be located at perisynaptic sites and could participate in the tonic inhibition of GABA suppressing neuronal excitability, which in the presence of 3-NP and HD is increased [8].

## 5. Conclusions

Little is known of the long-term behavior and of the changes that occur in the GABAergic synapses in striatal degeneration induced by mitochondrial dysfunction. Evidence suggests that adaptive changes occur in synaptic function, and some of them can be protective to counteract the pathology [45,46]. Our data showed that GABA<sub>C</sub> receptors exhibited a reduction in its function on striatal cells as a result of the mitochondria inhibition. Thus, further experiments should address the pharmacological profile and function of GABA<sub>C</sub> receptors in the projection neurons at the striatum and in behavioral evaluations. Moreover, this information invites us to explore GABAergic function in depth in particular GABA<sub>C</sub> receptors as a therapeutic target in striatal neurodegeneration produced by mitochondria dysfunction in HD and will help in the treatment of patients afflicted by HD.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2076-3425/8/12/217/s1>, Figure S1: Capacitance histogram, Figure S2: Reversal potential for GABA in recorded MSNs, Figure S3: Dose response of GABA in cholinergic interneurons.

**Author Contributions:** J.F.-H.: designed experiments, acquired data, J.A.G.-V. acquired and analyzed data, G.H.-C. acquired and analyzed data, E.N.-M. acquired and analyzed data, E.A.R.-L. acquired data, E.H.-E. conceived and designed experiments, analyzed data and wrote the paper.

**Funding:** This research was funded by the DGAPA-PAPIIT (IN201307) and CONACYT (81062) Grants to EHE.

**Acknowledgments:** Authors thank Ernesto Mendoza and Lorena Arroyo for their technical work.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Browne, S.E.; Howling, A.C.; MacGarvey, U.; Balk, M.; Bcrgvr, S.C.; Muqit, M.M.; Bird, E.D.; Beal, M.F. Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: Selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann. Neurol.* **1997**, *41*, 646–653. [[CrossRef](#)]
- Reddy, P.H.; Shirendeb, U.P. Mutant Huntingtin, Abnormal Mitochondrial Dynamics, Defective Axonal Transport of Mitochondria, and Selective Synaptic Degeneration in Huntington's Disease. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1822*, 101–110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mehrotra, A.; Sandhir, R. Mitochondrial cofactors in experimental Huntington's disease: Behavioral, biochemical and histological evaluation. *Behav. Brain Res.* **2014**, *261*, 345–355. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lane, R.K.; Hilsabeck, T.; Rea, S.L. The role of mitochondrial dysfunction in age-related diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1847*, 1387–1400. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ludolph, A.C.; He, F.; Spencer, P.S.; Hammerstad, J.; Sabri, M. 3-Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin. *Can. J. Neurol. Sci.* **1991**, *18*, 492–498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Beal, M.F.; Brouillet, E.; Jenkins, B.G.; Ferrante, R.J.; Kowall, N.W.; Miller, J.M.; Storey, E.; Srivastava, R.; Rosen, B.R.; Hyman, B.T. Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J. Neurosci.* **1993**, *13*, 4181–4192. [[CrossRef](#)]
- Borlongan, C.V.; Koutouzis, T.K.; Freeman, T.B.; Hauser, R.A.; Cahill, D.W.; Sanberg, R. Hyperactivity and hypo activity in a rat model of Huntington's disease: The systemic 3- nitropropionic acid model. *Brain Res. Protoc.* **1997**, *1*, 253–257. [[CrossRef](#)]
- Brouillet, E.; Jacquard, C.; Bizat, N.; Blum, D. 3-Nitropropionic acid: A mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *J. Neurochem.* **2005**, *95*, 1521–1540. [[CrossRef](#)]

9. Liu, H.-G.; Ma, Y.; Meng, D.-W.; Yang, A.-C.; Zhang, J.-G. A Rat Model of Hemidystonia Induced by 3-Nitropropionic Acid. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e79199. [[CrossRef](#)]
10. Vonsattel, J.P.; Nyers, R.H.; Stevens, T.; Ferrunte, R.; Bird, E.D.; Richardson, E.P., Jr. Neuropathological classification of Huntington's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1995**, *44*, 559–577. [[CrossRef](#)]
11. Borlongan, C.V.; Nishino, H.; Sanberg, P.R. Systemic but not intraparenchymal administration of 3-nitropropionic acid mimics the neuropathology of Huntington's disease: A speculative explanation. *Neurosci. Res.* **1997**, *28*, 185–189. [[CrossRef](#)]
12. Walker, F.O. Huntington's disease. *Lancet* **2007**, *369*, 218–228. [[CrossRef](#)]
13. Sieradzan, K.A.; Mann, D.M.A. The selective vulnerability of nerve cells in Huntington's disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **2001**, *27*, 1–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Kim, G.W.; Copin, J.C.; Kawase, M.; Chen, S.F.; Sato, S.; Gobbel, G.T.; Chan, P.H. Excitotoxicity is required for induction of oxidative stress and apoptosis in mouse striatum by the mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2000**, *20*, 119–129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Mirandola, S.R.; Melo, D.R.; Saito, A.; Castilho, R.F. 3-nitropropionic acid-induced mitochondrial permeability transition: Comparative study of mitochondria from different tissues and brain regions. *J. Neurosci. Res.* **2010**, *88*, 630–639. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Ade, K.K.; Jannsse, M.J.; Ortinski, P.I.; Vicini, S. Differential tonic GABA conductances in striatal medium spiny neurons. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 1185–1197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Santhakumar, V.; Jones, R.T.; Mody, I. Developmental regulation and neuroprotective effects of striatal tonic GABA currents. *Neurosci.* **2010**, *167*, 644–655. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Du, Z.; Tertrais, M.; Courtand, G.; Leste-Lasserre, T.; Cardoit, L.; Masméjean, F.; Halgan, C.; Cho, Y.H.; Garret, M. Differential alteration in expression of striatal GABAAR subunits in mouse models of Huntington's disease. *Front. Mol. Neurosci.* **2017**, *10*, 198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Rodríguez, E.; Rivera, I.; Astorga, S.; Mendoza, E.; García, F.; Hernández-Echeagaray, E. Uncoupling oxidative/energy metabolism with low sub chronic doses of 3-nitropropionic acid or iodoacetate in vivo produces striatal cell damage. *Int. J. Biol. Sci.* **2010**, *6*, 199–212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Nieto-Mendoza, E.; Hernández-Echeagaray, E. Dopaminergic Modulation of Striatal Inhibitory Transmission and Long-Term Plasticity. *Neural. Plast.* **2015**, *2015*, 1–15. [[CrossRef](#)]
21. Kumar, P.; Kalonia, H.; Kumar, A. Possible GABAergic mechanism in the neuroprotective effect of gabapentin and lamotrigine against 3-nitropropionic acid induced neurotoxicity. *Eur. J. Pharmacol.* **2012**, *674*, 265–274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Flores-Hernández, J.; Hernandez, J.; Snyder, G.L.; Yan, Z.; Fienberg, A.A.; Moss, S.J.; Greengard, P.; Surmeier, D.J. D1 dopamine receptor activation reduces GABA (A) receptor currents in neostriatal neurons through a PKA/DARPP-32/PPI signaling cascade. *J. Neurophysiol.* **2000**, *83*, 2996–3004. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Hernández-Echeagaray, E.; Cepeda, C.; Ariano, M.A.; Lobo, M.K.; Sibley, D.R.; Levine, M.S. Dopamine reduction of GABA currents in striatal Medium-Sized spiny Neurons is mediated principally by the D1 receptor subtype. *Neurochem. Res.* **2007**, *32*, 229–240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Xie, A.; Yan, J.; Yue, L.; Feng, F.; Mir, F.; Abdel-Halim, H.; Pepperberg, D.R. 2-Aminoethyl Methylphosphonate, a Potent and Rapidly Acting Antagonist of GABA $\rho$ 1 Receptors. *Mol. Pharmacol.* **2011**, *80*, 965–978. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Brown, N.; Kerby, J.; Bonnert, T.P.; Whiting, P.J.; Wafford, K.A. Pharmacological characterization of a novel cell line expressing human  $\alpha$ 4 $\beta$ 3 $\delta$ GABA receptors. *Br. J. Pharmacol.* **2002**, *136*, 965–974. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Mortensen, M.; Ebert, B.; Wafford, K.; Smart, T.G. Distinct activities of GABA agonists at synaptic-and extrasynaptic-type GABA receptors. *J. Physiol.* **2010**, *588*, 1251–1268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Krehan, D.; Frølund, B.; Ebert, B.; Nielsen, B.; Krogsgaard-Larsen, P.; Johnston, G.A.; Chebib, M. Aza-THIP and related analogues of THIP as GABA C. antagonists. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 4891–4896. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Johnston, G.A.R.; Chebib, M.; Hanrahan, J.R.; Mewett, K.N. Neurochemicals for the investigation of GABA $\rho$  Receptors. *Neurochem. Res.* **2010**, *35*, 1970–1977. [[CrossRef](#)]

29. Mendoza, E.; Miranda-Barrientos, J.; Vázquez-Roque, R.A.; Morales-Herrera, E.; Ruelas, A.; De la Rosa, G.; Flores, G.; Hernández-Echeagaray, E. Mitochondrial inhibition in vivo alters corticostriatal function and the modulatory effects of neurotrophins. *Neuroscience* **2014**, *280*, 156–170. [[CrossRef](#)]
30. Cepeda, C.; Starling, A.J.; Wu, N.; Nguyen, O.K.; Uzgil, B.; Soda, T.; Marjorie, V.M.A.; Levine, M.S. Increased GABAergic Function in Mouse Models of Huntington’s disease: Reversal by BDNF. *J. Neurosci. Res.* **2004**, *78*, 855–867. [[CrossRef](#)]
31. Rocher, A.B.; Gubellini, P.; Merienne, N.; Boussicault, L.; Petit, F.; Gipchtein, P.; Jan, C.; Hantraye, P.; Brouillet, E.; Bonvento, G. Synaptic scaling up in medium spiny neurons of aged BACHD mice: A slow-progression model of Huntington’s disease. *Neurobiol. Dis.* **2016**, *86*, 131–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Hines, R.M.; Davies, P.A.; Moss, S.J.; Maguire, J. Functional regulation of GABAA receptors in nervous system pathologies. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2011**, *22*, 1–7.
33. Bianchi, M.T.; Macdonald, R.L. Slow phases of GABA(A) receptor desensitization: Structural determinants and possible relevance for synaptic function. *J. Physiol.* **2002**, *544*, 3–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Haas, K.F.; Macdonald, R.L. GABAA receptor subunit  $\gamma 2$  and  $\delta$  subtypes confer unique kinetic properties on recombinant GABAA receptor currents in mouse fibroblasts. *J. Physiol.* **1999**, *514*, 27–45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Saxena, N.C.; Macdonald, R.L. Assembly of GABA(A) receptor subunits: Role of the delta subunit. *J. Neurosci.* **1994**, *14*, 7077–7086. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Graveland, G.A.; Williams, R.S.; DiFiglia, M. Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington’s disease. *Science* **1985**, *227*, 770–773. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Ferrante, R.; Kowall, N.W.; Beal, M.F.; Martin, J.B.; Bird, E.D.; Richardson, E.P., Jr. Morphologic and histochemical characteristics of a spared subset of striatal neurons in Huntington’s disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1987**, *46*, 12–27.
38. Quirk, K.; Blurton, P.; Fletcher, S.; Leeson, P.; Tang, F.; Mellilo, D.; Ragan, C.I.; McKernan, R.M. [ $^3\text{H}$ ] L-655,708, a novel ligand selective for the benzodiazepine site of GABA<sub>A</sub> receptors which contain the  $\alpha 5$  subunit. *Neuropharmacology* **1996**, *35*, 1331–1335. [[CrossRef](#)]
39. Nusser, Z.; Sieghart, W.; Somogyi, P. Segregation of different GABA(A) receptors to synaptic and extrasynaptic membranes of cerebellar granule cells. *J. Neurosci.* **1998**, *18*, 1693–1703. [[CrossRef](#)]
40. Drasbek, K.R.; Jensen, K. THIP, a Hypnotic and Antinociceptive Drug, Enhances an Extrasynaptic GABAA Receptor-mediated Conductance in Mouse Neocortex. *Cer. Cortex* **2006**, *16*, 1134–1141. [[CrossRef](#)]
41. Rosas-Arellano, A.; Machuca-Parra, A.I.; Reyes-Haro, D.; Miledi, R.; Martinez-Torres, A. Expression of GABA rho receptors in the neostriatum: Localization in aspiny, medium spiny neurons and GFAP-positive cells. *J. Neurochem.* **2012**, *122*, 900–910. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Pan, Z.H.; Zhang, D.; Zhang, X.; Lipton, S.A. Evidence for coassembly of mutant GABAC rho1 with GABAA gamma2S, glycine alpha1 and glycine alpha2 receptor subunits in vitro. *Eur. J. Neurosci.* **2000**, *12*, 3137–3145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Milligan, C.J.; Buckley, N.J.; Garret, M.; Deuchars, J.; Deuchars, S.A. Evidence for inhibition mediated by coassembly of GABAA and GABA-C receptor subunits in native central neurons. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 7241–7250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Kumar, U.; Heer, M.; Somvanshi, R.K. Regional and subcellular distribution of GABAC rho3 receptor in the brain of R6/2 mouse model of Huntington’s Disease. *Neurosci. Lett.* **2017**, *640*, 81–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Hasbani, M.J.; Underhill, S.M.; De Erasquin, G.A.; Goldberg, M.P. Synapse loss and regeneration: A mechanism for functional decline and recovery after cerebral ischemia? *Neuroscientist* **2000**, *6*, 110–119. [[CrossRef](#)]
46. Belelli, D.; Harrison, N.L.; Maguire, J.; Macdonald, R.L.; Walker, M.C.; Cope, D.W. Extrasynaptic GABA<sub>A</sub> receptors: Form, Pharmacology and Function. *J. Neurosci.* **2009**, *29*, 12757–12763. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



## Comparación de la sertralina y del extracto metanólico de *Psilocybe Cubensis* sobre la calidad espermática en un modelo de depresión inducido por estrés temprano en ratas

C. Galicia-Ramírez<sup>a</sup>, E. Ruíz-Luna<sup>a</sup>, A. Rodríguez-Rubí<sup>b</sup>, G. Hernández-Carballo<sup>a</sup>,  
U. Quiroz-López<sup>b</sup>, R. Reyes-Luna<sup>c</sup>, and J. Flores-Hernández<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Neuromodulación, Instituto de Fisiología,  
Benemérita Universidad Autónoma Puebla.

<sup>b</sup>Laboratorio de Histofisiología, Facultad de Ciencias Biológicas,  
Benemérita Universidad Autónoma Puebla.

<sup>c</sup>Laboratorio de Reproducción, Facultad de Ciencias Biológicas,  
Benemérita Universidad Autónoma Puebla.

e-mail: uquiroz@yahoo.com.mx

Received 9 September 2019; accepted 19 March 2020

La depresión es un problema de salud mundial. La sertralina, un antidepresivo de uso común, puede ocasionar efectos secundarios en la fertilidad. El tratamiento con alucinógenos, por ejemplo, la psilocibina, se considera un procedimiento alternativo para tratar la depresión. El objetivo de este trabajo fue comparar los efectos de la administración sub-crónica del extracto metanólico de *P. cubensis* o de sertralina sobre la calidad espermática de ratas macho. Treinta ratas machos Sprague-Dawley se distribuyeron en cinco grupos ( $n = 6$ ). Un grupo testigo absoluto (TA) de animales no separados de la madre; animales separados de la madre (Vetulani, 2013; DEP); medicados diariamente con sertralina (5 mg/kg; DEP+SERT); administrados con extracto metanólico de *P. cubensis* (0.1 mg/kg; DEP+EXTR); y con solución salina + 1 % de Tween 80 como vehículo (DEP+VH). La administración se realizó desde el día 45 de edad y hasta el día 60. Los animales fueron sacrificados a los seis meses de edad. Se disecaron los epidídimos y se obtuvieron espermatozoides de la cola. Se cuantificó el número total y la viabilidad de los espermatozoides, así como el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva rápida, lenta, in situ e inmóviles. La concentración ( $F = 1.25624$ ;  $p = 0.3133$ ), el porcentaje de viabilidad ( $F = 0.96249$ ;  $p = 0.44528$ ), de inmovilidad ( $F = 2.31662$ ;  $p = 0.08509$ ), y de motilidad progresiva lenta ( $F = 0.09148$ ;  $p = 0.98428$ ) de los espermatozoides no mostraron diferencias significativas entre grupos. La prueba de comparación de medias de Tukey arrojó que el porcentaje de motilidad progresiva rápida en SERT es menor con respecto a TA ( $\alpha = 0.05$ ;  $p = 0.04166$ ), y EXTR ( $\alpha = 0.05$ ;  $p = 0.01971$ ). Además, el porcentaje de espermatozoides in situ en EXTR es más bajo con respecto VH ( $\alpha = 0.05$ ;  $p = 0.00348$ ), y TA ( $\alpha = 0.05$ ;  $p = 0.00619$ ). Nuestros resultados sugieren que el uso del extracto metanólico de *P. Cubensis* no afecta los parámetros de fertilidad a diferencia de la sertralina que afecta principalmente la motilidad.

*Descriptor:* Sertralina; Sprague-Dawley.

Depression is a global health problem. Sertraline, a commonly used antidepressant, can cause side effects on fertility. Hallucinogen treatment, for example, psilocybin, is considered an alternative procedure to treat depression. The objective of this work was to compare the effects of sub-chronic administration of the methanolic extract of *P. cubensis* or sertraline on the sperm quality of male rats. Thirty male Sprague-Dawley rats were distributed into five groups ( $n = 6$ ). An absolute control group (AT) of animals not separated from the mother; animals separated from the mother (Vetulani, 2013; DEP); medicated daily with sertraline (5 mg/kg; DEP+SERT); administered with methanolic extract of *P. cubensis* (0.1 mg/kg; DEP+EXTR); and with saline + 1 % Tween 80 as vehicle (DEP+VH). The administration was carried out from the 45th day of age until the 60th day. The animals were sacrificed at six months of age. The epididymides were dissected and sperm were obtained from the tail. The total number and viability of the sperm were quantified, as well as the percentage of sperm with fast, slow, in situ, and immobile progressive motility. The concentration ( $F = 1.25624$ ;  $p = 0.3133$ ), the percentage of viability ( $F = 0.96249$ ;  $p = 0.44528$ ), immobility ( $F = 2.31662$ ;  $p = 0.08509$ ), and slow progressive motility ( $F = 0.09148$ ;  $p = 0.98428$ ) of the sperm did not show significant differences between groups. Tukey's mean comparison test showed that the percentage of rapid progressive motility in SERT is lower with respect to TA ( $\alpha = 0.05$ ;  $p = 0.04166$ ), and EXTR ( $\alpha = 0.05$ ;  $p = 0.01971$ ). Furthermore, the percentage of sperm in situ in EXTR is lower with respect to VH ( $\alpha = 0.05$ ;  $p = 0.00348$ ), and TA ( $\alpha = 0.05$ ;  $p = 0.00619$ ). Our results suggest that the use of *P. Cubensis* methanolic extract does not affect fertility parameters, unlike sertraline, which mainly affects motility.

*Keywords:* Sertraline; Sprague-Dawley.

### 1. Introducción

La depresión es un problema de salud mundial. En el 2015, el número de personas con depresión excedió los 300 millones. Las consecuencias de este desorden en términos de pérdida de salud son enormes. La depresión es catalogada por la OMS (Organización Mundial de la Salud) como la mayor

causa de discapacidad global, y como el mayor contribuyente a las muertes por suicidio, alrededor de 800 000 por año. Las tasas de prevalencia alcanzan un máximo en la edad adulta; también ocurre en niños y adolescentes menores de 15 años, pero a un nivel más bajo que los grupos de mayor edad [1].

Existe una gama amplia de fármacos para tratar la depresión. Se ha reportado que la sertralina, un antidepresivo

de uso común, actúa como un inhibidor de la recaptura de serotonina atenuando la depresión. No obstante, se ha reportado que puede ocasionar efectos secundarios en la fertilidad, tales como la disminución en el recuento de espermatozoides acompañado por un aumento en la morfología anormal de los mismos, el daño al ADN y la degeneración en las estructuras celulares tubulares [2].

La combinación de factores familiares, sociales, psicológicos y biológicos pueden favorecer el desarrollo de la depresión, aunque esta condición también puede surgir a partir de enfermedades físicas, o alteraciones en el hipotálamo [3]. Si bien se trata de una condición multifactorial, algunos de los síntomas depresivos pueden estudiarse en roedores tales como la anhedonia y el estrés a través de la desesperación conductual en modelos animales generados por medio de la separación materna [4,5].

Recientemente se ha propuesto el uso de alucinógenos, entre ellos, la psilocibina como procedimiento alternativo para tratar la depresión en pacientes con cáncer terminal. Se observó un efecto terapéutico que perduró hasta seis meses con acompañamiento psicológico [6]. A menudo el consumo de hongos pertenecientes al género *Psilocybe* no tiene repercusiones en la salud del consumidor. Sin embargo, recientemente se reportó un cuadro clínico de sintomatología de lesión aguda renal presuntamente debido al consumo de *P. cubensis* [7]. Por otra parte, se desconoce si la psilocibina tiene efectos secundarios sobre la calidad espermática, por lo que resulta de gran importancia contar con tratamientos antidepressivos no sólo eficaces, sino también sin efectos secundarios.

## 2. Hipótesis

Si se administran el extracto metanólico de *P. cubensis* y de sertralina en ratas macho de un modelo de depresión por estrés temprano, entonces el efecto en los parámetros de fertilidad será distinto.

## 3. Objetivo

Comparar los efectos de la administración sub-crónica del extracto metanólico de *P. cubensis* y de sertralina sobre la calidad espermática de ratas macho.

## 4. Metodología

Treinta ratas macho de la cepa Sprague-Dawley siguieron el protocolo de separación materna desde el día postnatal uno hasta el día posnatal 22 durante 180 minutos diariamente [4]. Posteriormente, se distribuyeron en cinco grupos ( $n = 5$ ), como siguen: un grupo testigo absoluto de animales no separados de la madre (TA); animales separados de la madre sin ningún tipo de administración (DEP); animales separados de la madre y medicados diariamente con 5 mg/kg de sertralina (DEP+SERT); animales separados de la madre administrados

diariamente con 0.1 mg/kg del extracto metanólico de *Psilocybe cubensis* (DEP+EXTR); y, finalmente, animales separados de la madre administrados con solución salina + 1 % de Tween 80 como vehículo (DEP+VH). La administración se realizó desde el día 45 y hasta el día 60 de edad.

Se realizó un ensayo cualitativo para demostrar la presencia de psilocina y psilocibina en el extracto metanólico de *P. cubensis*. Sin embargo, no conocemos con exactitud todos los componentes ni su concentración, por lo cual, se abre una nueva línea de investigación para ahondar más en el estudio molecular del extracto.

Con respecto al diseño experimental, los animales fueron sacrificados a los seis meses de edad por sobredosis de anestesia (Admón. i.p. Pentobarbital sódico). Se obtuvieron espermatozoides por perfusión de la cola del epidídimo con 3 mL de solución Hartman y se mantuvieron a 37°C hasta su análisis. Se procesaron dos muestras por individuo, correspondientes a los epidídimos de cada lado (derecho e izquierdo). Para el análisis espermático se siguió la metodología indicada en el manual para el análisis de semen humano bajo parámetros establecidos por la OMS [8].

### 4.1. Motilidad espermática

Primeramente, se evaluó la motilidad espermática colocando una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  de muestra sobre un portaobjetos y cubriéndola con un cubreobjetos de 22  $\times$  22 mm, una vez enfocada la muestra bajo el objetivo 40 $\times$  de un microscopio óptico modelo primo star (Carl Zeiss) se contaron más de 200 espermatozoides y se clasificaron en motilidad A (progresiva), esta a su vez en AR (motilidad progresiva rápida) y AL (motilidad progresiva lenta), motilidad B (no progresiva o in situ) y motilidad C (inmóvil).

### 4.2. Concentración espermática

Finalmente, para el análisis de la concentración espermática se colocó 10  $\mu\text{L}$  de muestra sobre un portaobjetos y cubriéndola con un cubreobjetos de 22  $\times$  22 mm se contaron los espermatozoides de tres campos completos dentro de la muestra. Después se obtuvo el promedio de dicho conteo para preparar una muestra secundaria con ayuda de las tablas de referencia para el conteo de espermatozoides del manual basado en la OMS. En esta segunda muestra, se diluyó parte de la muestra con diluyente Weimman, de este modo se aseguró que ningún espermatozoide presentara motilidad. Por último, se colocó 10  $\mu\text{L}$  de la muestra secundaria en una cámara de Neubauer de doble retículo (Marienfeld Superior) para el conteo de los espermatozoides en las cuadrículas centrales; el conteo total de las dos cámaras (CT) y los valores obtenidos a lo largo de este procedimiento se usaron para obtener el factor de conversión (FC). Con estos valores y con ayuda de las tablas proporcionadas por el manual se obtuvo el número de espermatozoides usando la siguiente fórmula:  $((\text{CT}/2)/\text{FT})/3$ . Los datos fueron analizados estadísticamente a través del programa R<sup>®</sup>.

## 5. Resultados

Los datos nos mostraron una distribución normal y por la  $n$  utilizada se procedió a usar pruebas estadísticas no paramétricas. Se presentan los valores de  $\chi^2$  como estadístico de asociación entre variables. Los resultados de la prueba Kruskal-Wallis muestran que el número ( $p = 0.539$ ), el porcentaje de viabilidad ( $p = 0.504$ ), de motilidad progresiva lenta ( $p = 0.693$ ) y rápida ( $p = 0.038$ ) de los espermatozoides no mostraron diferencias significativas entre grupos.

Con respecto al porcentaje movilidad total de espermatozoides (Fig. 1;  $\chi^2 = 10.961$ ,  $p = 0.027$ ), se encontró que en ratas deprimidas la administración de sertralina provoca una

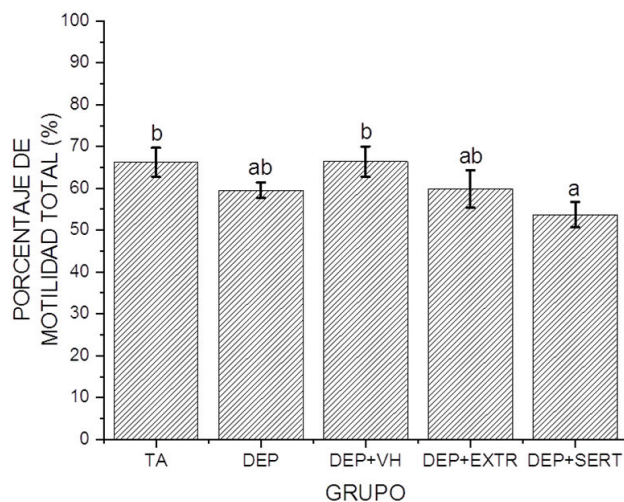


FIGURA 1. Porcentaje de motilidad espermática total. El análisis Kruskal-Wallis junto con la prueba de Dunn, sugieren que la concentración de espermatozoides fue menor en los animales administrados con sertralina con respecto a las ratas sanas ( $p = 0.0233$ ) y los animales deprimidos tratados con solución salina ( $p = 0.0213$ ).

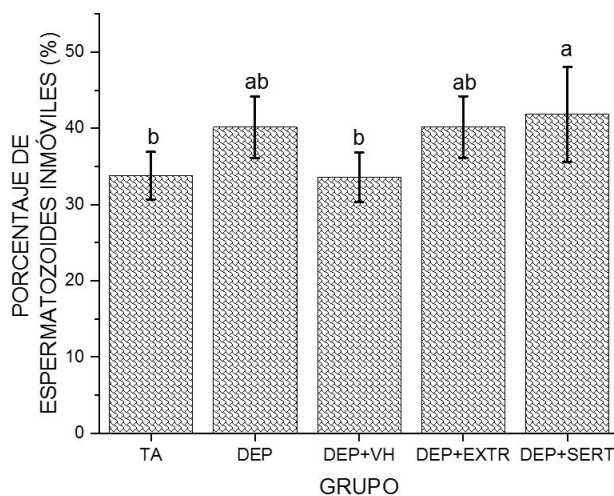


FIGURA 2. Porcentaje total de espermatozoides inmóviles. El análisis Kruskal-Wallis junto con la prueba de Dunn, demuestran que en DEP+SERT el porcentaje es mayor con respecto a DEP+VH ( $p = 0.027$ ), y con TA ( $p = 0.033$ ).

disminución del porcentaje de motilidad total de espermatozoides con respecto a las ratas que no sufrieron el protocolo de separación materna ( $p = 0.033$ ) y con los animales deprimidos y administrados con solución salina ( $p = 0.0213$ ).

En la Fig. 2 ( $\chi^2 = 10.1596$ ,  $p = 0.04$ ), se observa que el porcentaje de inmovilidad espermática en los animales deprimidos medicados con sertralina es mayor con respecto a los animales deprimidos administrados con solución salina ( $p = 0.027$ ), y en comparación con los animales que no pasaron por el protocolo de separación materna ( $p = 0.033$ ). El análisis realizado, no sugiere diferencias entre los grupos TA y DEP+EXTR ( $p = 0.16$ ).

## 6. Discusión

El análisis de datos sostiene que los animales del grupo DEP+SERT, presentaron un aumento de espermatozoides inmóviles, aún mayor que los animales deprimidos sin una administración efectiva. Estos resultados son consistentes con lo reportado por otros autores donde la motilidad espermática se ve disminuida tras la administración de sertralina en ratones, así como de los niveles séricos de LH y testosterona [9], hormonas importantes en la regulación de la espermatogénesis.

Estos efectos podrían ser consecuencia de alteraciones en el sistema serotoninérgico, ya que se sabe que estructuras como las vías aferentes del sistema reproductor, el epidídimo, células de Sertoli y Leydig, poseen receptores afines a este neurotransmisor [10,11]. Esta condición los hace susceptibles de ser afectados por inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, como la sertralina, alterando su funcionamiento normal [13]. Se han reportado alteraciones en la morfología del testículo de ratones con tratamiento farmacológico de sertralina [13], además de los parámetros de dispersión de la cromatina, viabilidad y morfología espermática en hombres con un tratamiento con este antidepresivo [14].

Adicionalmente, el estado depresivo causado por la separación materna a una edad temprana es motivo de estrés psicológico, el cual podría representar otro factor importante que repercuta en la calidad espermática, dado que se ha mostrado que disminuye los niveles de testosterona [15]. En la rata intacta la administración de sertralina provoca hipogonadismo mediante una disminución en la esteroidogénesis. Interesantemente después se presenta una respuesta compensatoria a través de un incremento en los niveles de la LH [16], lo que nos permite plantear la posibilidad de que la respuesta neuroendocrina ante la administración de la sertralina es diferente en el animal deprimido en comparación al intacto.

La presente investigación evidencia que la administración del extracto metanólico de *P. cubensis* en ratas deprimidas disminuye la alta concentración de espermatozoides *in situ*, es decir, hay un efecto de recuperación. Sin embargo, la relación entre el sistema serotoninérgico y el desarrollo reproductivo de ratas macho es poco explorada. Son necesarios estudios más profundos para dilucidar la interacción de estos

dos componentes, y más aún qué mecanismos activa o potencia el extracto de *P. cubensis* involucrados en la calidad espermática. También se requieren más estudios para descartar que el extracto de *Psilocybe cubensis* no afecta el eje neuroendocrino hipotálamo-hipófisis-testículos.

## 7. Conclusión

Nuestros resultados sugieren que, en el modelo en rata con inducción a depresión por restricción materna, la administración del extracto metanólico de *Psilocybe cubensis* tiene un efecto de mejora al disminuir el porcentaje de espermatozoides in situ. En contraste con el tratamiento con sertralina que disminuye significativamente la motilidad del espermatozoide en ratas deprimidas.

1. World Health Organization, *Depression and other common mental disorders: global health estimates*, (World Health Organization, Geneva, 2017), pp. 4-17.
2. O. Atli, *et al.*, Sertraline-induced reproductive toxicity in male rats: evaluation of possible underlying mechanisms, *Asian Journal of Andrology* **19** (2017) 672. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.192637>
3. S. C. Andrey y F. T. Jaime, Neurobiología de la depresión *Rev. Mex. Neuroc.* **10** (2009) 462.
4. J. Vetulani, Early maternal separation: a rodent model of depression and a prevailing human condition, *Pharmacological Reports* **65** (2013) 1451. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(13\)71505-6](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(13)71505-6)
5. D. A. Slattery y J. F. Cryan, Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents, *Nature Protocols* **7** (2012) 1009. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.044>
6. R. R. Griffiths *et al.*, Psilocybin produces substantial and sustained decreases in depression and anxiety in patients with life-threatening cancer: A randomized double-blind trial, *J. Psychopharmacol.* **30** (2016) 1181. <https://doi.org/10.1177/0269881116675513>
7. E. Austin *et al.*, Acute renal injury cause by confirmed *Psilocybe cubensis* mushroom ingestion, *Med. Mycol. Case Rep.* **23**(2019) 55-57. <https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2018.12.007>
8. R. Reyes-Luna, *Curso-Taller Análisis de semen humano con base a los parámetros de la OMS y fragmentación del ADN espermático* (Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, 2015), pags. 8-18.
9. M. H. Jahromy y A. A. Moghadam, Effects of Sertraline on Sperm Motility, Number and Viability and Its Relation to Blood Levels of Testosterone, FSH and LH in Adult Male Mice, *Adv. Sex. Med.* **4** (2014) 17. <http://dx.doi.org/10.4236/asm.2014.42004>
10. D. W. P. Hay y R. M. Wadsworth, The Contractile Effects of 5-hydroxytryptamine on the Rat Isolated Vas Deferens, *Br. J. Pharmacol.* **77** (1982) 605. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1982.tb09338.x>
11. F. Jiménez-Trejo, *et al.*, Evidence of 5-HT components in human sperm: implications for protein tyrosine phosphorylation and the physiology of motility, *J. Androl.* **28** (2007) 136. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0145>
12. F. Erdemir *et al.*, The effect of Sertraline, Paroxetine, Fluoxetine and Escitalopram on testicular tissue and oxidative stress parameters in rats, *Int. Braz. J. Urol.* **40** (2014) 100. <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-5538.IBJU.2014.01.15>
13. Z. Sepehrmanesh *et al.*, Comparison of the Effect of Sertraline With Behavioral Therapy on Semen Parameters in Men With Primary Premature Ejaculation, *Urology* **83** (2014) 800. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2013.12.004>
14. G. F. Gonzales, M. Garcia-Hjarles y G. Velasquez, Hyperprolactinaemia and Hyperserotoninaemia: Their Relationship to Seminal Quality, *Andrologia* **24** (1992) 95. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1992.tb02617.x>
15. V. H. Nargund, Effects of Psychological Stress on Male Fertility, *Nat. Rev. Urol.* **12** (2015) 373. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2015.112>
16. C.H. Munkboel *et al.*, Sertraline Suppresses Testis and Adrenal Steroid Production and Steroidogenic Gene Expression While Increasing LH in Plasma of Male Rats Resulting in Compensatory Hypogonadism, *Toxicol. Sci.* **163** (2018) 609. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy059>