



UADY

CIENCIAS DE LA SALUD

POSGRADO INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS DE LA SALUD

**MODULACIÓN DE LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA GLUTAMATÉRGICA
MEDIADA POR SEROTONINA ENDÓGENA Y EXÓGENA EN LAS CAPAS
II/III DE LA CORTEZA AUDITIVA DE RATAS WISTAR JUVENILES**

Tesis presentada por:

Víctor Manuel Cervantes Ramírez

Correo: a10017991@alumnos.uady.mx

En opción al grado:

Maestro en investigación en salud

Directores de tesis

Dr. Humberto Salgado Burgos

Dr. Juan Carlos Pineda Cortes

Mérida Yucatán 30 de agosto de 2018

Esta tesis no se hubiera realizado sin el apoyo de la beca al número de CVU
785201 Otorgada por el CONACYT

Este trabajo se realizó con el apoyo otorgado por el CONACYT: CB-2011-
168943

Agradecimiento

A **mi director de tesis**, por su enseñanza y apoyo a lo largo de mi formación académica, por brindarme confianza y consejo como mentor.

A **mis revisores de tesis** por el tiempo dedicado a la revisión de mi trabajo y por su aportación a mi formación académica.

Al **laboratorio de Neuroplasticidad** por brindarme el apoyo para la realización de los experimentos.

Al **personal del bioterio del "CIR-UADY"** por facilitarme lo esencial para la realización de esta tesis.

A **mis compañeros del laboratorio** por su apoyo en los experimentos y su amistad.

Índice

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	5
• La corteza cerebral.....	5
• La corteza auditiva.....	8
• Aferencia glutamatérgica y conectividad de la corteza auditiva.....	8
• Serotonina en el sistema nervioso central.....	11
• Liberación de serotonina.....	13
• Modulación de la liberación de 5HT.....	14
• Concentración fisiológica de la 5-HT en el cerebro de la rata.....	15
• Acciones de la serotonina en la corteza auditiva.....	16
• Función de la serotonina en la corteza auditiva.....	20
3.-Planteamiento del problema.....	21
4. Preguntas de investigación.....	22
5. Hipótesis.....	23
6. Objetivos.....	23
7. Objetivos específicos.....	23
8. Materiales y métodos.....	24
• Preparación.....	24
• Registros electrofisiológicos.....	25
• Técnica de pulso pareado.....	27
• Diseño experimental.....	29
• Procesamiento de datos (estadística a aplicar) y presentación de resultados.....	31
• Grupos experimentales.....	32
• Consideraciones éticas.....	32

9. Resultados.....	33
10. Discusiones.....	57
11. Conclusiones.....	63
12. Referencias bibliográficas.....	64

Índice de cuadros o tablas

Cuadro 1. Receptores de la 5-HT y sus vías de señalización intracelular.....	13
Cuadro 2. Acciones moduladoras de la 5-HT y sus receptores en la corteza cerebral.....	19

Índice de figuras

Figura 1. Patrones de conectividad en la corteza auditiva de la rata.....	10
Figura 2. Conexiones sinápticas de las neuronas de la capa II/III de la corteza auditiva de la rata.....	11
Figura 3: Expresión de los receptores 5-HT _{1A} en la corteza auditiva de la rata.....	18
Figura 4. Resumen de antecedentes y preguntas de investigación.....	23
Figura 5: Corte coronal de cerebro de rata.....	25
Figura 6: Posición de los electrodos de registro y estimulación en la capa II/III de la corteza auditiva.....	27
Figura 7. Esquema representativo de la técnica de pulso pareado.....	29

Figura 8: Representación del curso temporal de un experimento.....	30
Figura 9.- Corrientes postsinápticas excitadoras farmacológicamente aisladas.....	34
Figura 10. Efecto de la 5-HT (100 nM) sobre las corrientes sinápticas glutamatérgicas en la capa II/III de la corteza auditiva de la rata.....	35
Figura 11. Efecto de la aplicación de 100nM de la 5-HT sobre la relación de pulso pareado (RPP).....	35
Figura 12. Efecto de la 5-HT (500 nM) sobre las corrientes sinápticas glutamatérgicas en la capa II/III de la corteza auditiva de la rata.....	36
Figura 13. Efecto de la aplicación de 500 nM de la 5-HT sobre la relación de pulso pareado (RPP).....	37
Figura 14. Efecto de la 5-HT (1 μ M) sobre las corrientes sinápticas glutamatérgicas en la capa II/III de la corteza auditiva de la rata.....	38
Figura 15, Efecto de la aplicación de 1 μ M de la 5-HT sobre la relación de pulso pareado (RPP).....	39
Figura 16. Efecto de la 5-HT (5 μ M) sobre las corrientes sinápticas glutamatérgicas en la capa II/III de la corteza auditiva de la rata.....	40
Figura 17. Efecto de la aplicación de 5 μ M de la 5-HT sobre la relación de pulso pareado (RPP).....	41
Figura 18. Efecto de la 5-HT (10 μ M) sobre las corrientes postsinápticas excitadoras en la capa II/III de la corteza auditiva de la rata.....	42
Figura 19. Efecto de la aplicación de 10 μ M de la 5-HT sobre la relación de pulso pareado (RPP).....	43
Figura 20. Curva dosis-efecto de la 5-HT sobre las corrientes sinápticas glutamatérgicas en la capa II/III de la corteza auditiva de la rata...	44
Figura 21. Efecto de DOI sobre CPSEs normalizadas.....	45
Figura 22. Efecto de la aplicación de DOI sobre la relación de pulso pareado (RPP).....	46
Figura 23. Efecto del agonista del receptor 5-HT _{1A} sobre las CPSEs.....	47
Figura 24. Efecto de la aplicación de 8-OH-DPAT sobre la	

relación de pulso pareado (RPP).....	48
Figura 25. Efecto de los antagonistas del receptor 5HT _{1A} (NAN-190) y 5-HT _{2A} (Ritanserina), en presencia de la 5-HT (5 μM) sobre las CPSEs.....	49
Figura 26. Efecto del citalopram sobre CPSEs.....	51
Figura 27. Efecto de la aplicación del citalopram sobre la relación de pulso pareado (RPP).....	52
Figura 28. Efecto del citalopram en presencia de ritanserina sobre las CPSEs.....	53
Figura 29. Efecto de la aplicación del citalopram y ritanserina sobre la relación de pulso pareado (RPP).....	53
Figura 30. Efecto del citalopram en presencia de NAN-190 sobre las CPSE.....	54
Figura 31. Efecto de la aplicación del citalopram y NAN-190 sobre la relación de pulso pareado (RPP)	55
Figura 32. El citalopram reduce la transmisión sináptica glutamatérgica vía activación de los receptores 5-HT ₁	56
Figura 33. Representación del mecanismo de acción de la 5-HT.....	57

Abreviaturas

CPSEs: Corrientes postsinápticas excitadoras

5-HT: Serotonina

GABA: Ácido γ amino butírico

GLU: ácido glutámico

AMPA: Ácido α-amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

NMDA: N-metil-D-aspartato

PLC: Fosfolipasa C

IP3: Inositol trifosfato

DAG: Diacilglicerol

PKC: Proteína quinasa C

PKA: Proteína quinasa A

MAO A: Monoamino oxidasa A

LCE: Líquido cerebroespinal

[(±)-8-OH-DPAT]: (±)-8-hidroxi-2-dipropilaminotetralina

DOI: 2,5-dimetoxi-4-iodoamfetamina

PP1: Proteína fosfatasa 1

CaMKII: Proteína calcio calmodulina quinasa II

AMPc: 3',5'-adenosín monofosfato cíclico

Resumen

Diversos estudios reportan una disminución en la amplitud de los potenciales evocados auditivos por la administración de fármacos inhibidores de la recaptura de la serotonina (5-HT), los cuales incrementa la concentración extracelular de la 5-HT, sugiriendo que este neurotransmisor juega un papel importante en la modulación de la actividad de la corteza auditiva. En las neuronas de la corteza auditiva se han identificado mediante métodos de inmunohistoquímica, la expresión de receptores 5-HT₁ y 5-HT₂ serotoninérgicos. Sin embargo, el papel que tiene la serotonina en la corteza auditiva aún no es claro. El objetivo del presente estudio consistió en investigar el papel modulador de la 5-HT exógena y endógena sobre la transmisión sináptica glutamatérgica en la capa II/III de la corteza auditiva de ratas juveniles. Para ello, se realizaron experimentos con la técnica de fijación de voltaje en la configuración célula completa en neuronas piramidales de las capas II/III. Mediante herramientas farmacológicas se estudió el efecto de la aplicación de la 5-HT y un fármaco inhibidor de la recaptura de la 5-HT (citalopram). La aplicación de la 5-HT causó una reducción de las corrientes sinápticas glutamatérgicas (CPSEs), efecto dependiente de la concentración aplicada, con un efecto máximo de reducción en la amplitud de las CPSEs de $31.90 \pm 2.87\%$ y una concentración efectiva media (CE₅₀) de $1.035 \mu\text{M}$. La aplicación de la 5-HT ($5 \mu\text{M}$) disminuyó significativamente las CPSEs en un $27 \pm 3.4\%$ con respecto al control, sin cambiar la relación de pulso pareado, sugiriendo que su efecto se localiza a nivel de la neurona postsináptica. La administración conjunta de los antagonistas de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} (NAN-190 y Ritanserina, respectivamente), previnieron la reducción en la amplitud de las CPSEs por la aplicación de la 5-HT, sugiriendo que ambos receptores son activados por la 5-HT para modular la transmisión sináptica glutamatérgica en las capas II/III de la corteza auditiva.

Por otro lado, la aplicación del citalopram causó una reducción de la amplitud de las CPSEs en un $14 \pm 3.1 \%$. Este efecto fue bloqueado por la aplicación previa del antagonista del receptor 5-HT_{1A} (NAN-190). Los resultados sugieren

que la administración del citalopram incrementa la concentración extracelular de la 5-HT (5-HT endógena) a una concentración de 823 nM, concentración que activa únicamente a los receptores 5-HT_{1A}. En conclusión, los resultados sugieren una diferencia en la modulación de la transmisión sináptica glutamatérgica por la 5-HT exógena y endógena. La 5-HT exógena activa a los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} para reducir la transmisión sináptica glutamatérgica. En tanto que el fármaco inhibidor de la recaptura de la 5-HT (citalopram), incrementó la concentración de la 5-HT endógena para activar únicamente a los receptores 5-HT_{1A} (823 nM), con la subsecuente reducción de la transmisión sináptica glutamatérgica.

Introducción

En el sistema nervioso central se encuentran numerosos sistemas de neurotransmisores que regulan la actividad de los circuitos neuronales. Uno de estos sistemas es el serotoninérgico, conformado por las neuronas de los núcleos del Rafe, las cuales pueden sintetizar, almacenar, liberar, recapturar y degradar a la serotonina (5-HT). Estas neuronas emiten sus proyecciones a todo el sistema nervioso central incluyendo la corteza cerebral ⁽¹⁾. La amplia distribución de las proyecciones del sistema serotoninérgico lo involucran en numerosas funciones fisiológicas, entre las cuales se encuentran, funciones cognitivas como el aprendizaje y la memoria ⁽²⁾, la regulación de ritmos circadianos (como el ciclo sueño-vigilia) ⁽³⁻⁴⁾, la conducta sexual ⁽⁵⁾, entre otras. Además de estas funciones, se ha reportado que alteraciones en el sistema serotoninérgico están involucradas en diferentes trastornos psiquiátricos ⁽⁶⁾ como la depresión ⁽⁷⁾ y esquizofrenia ⁽⁸⁻⁹⁾. De hecho, en la corteza auditiva se ha reportado que en sujetos con depresión mayor se reducen los niveles de la 5-HT ⁽¹⁰⁻¹¹⁾. Sin embargo, en la corteza auditiva existen pocos estudios que ayuden a explicar la función del sistema serotoninérgico y la de sus receptores. Un estudio reporta que la serotonina reduce la frecuencia de disparo de potenciales de acción de las neuronas piramidales de la corteza auditiva de ratas ⁽¹²⁾. Otro estudio realizado en nuestro laboratorio muestra que la

serotonina inhibe la transmisión sináptica GABAérgica por activar a los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} en ratas con edades postnatales (25-30 días) ⁽¹³⁾. Por último, otro estudio indica que la serotonina modula diferencialmente la transmisión sináptica GABAérgica durante el desarrollo posnatal de ratas, reduciendo la transmisión sináptica GABAérgica en etapas tempranas del desarrollo a través de la activación de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} e incrementando la transmisión sináptica GABAérgica en etapas juveniles-adultas a través de la activación de los receptores 5-HT₃ ⁽¹⁴⁾.

A pesar de ello, se desconoce cómo puede ser afectada la transmisión sináptica glutamatérgica por la activación de los receptores de la 5-HT. Por lo que, en este estudio nos propusimos estudiar los mecanismos fisiológicos que ocurren en la modulación de la transmisión sináptica glutamatérgica por la aplicación de la serotonina exógena y por el incremento de la 5-HT endógena causada por la aplicación del fármaco inhibidor de la recaptura de este neurotransmisor (citalopram), en las capas II/III de la corteza auditiva de ratas juveniles con edades postnatales de 25-30 días.

Entre las incógnitas que se resolvieron con el presente estudio se encuentran: A) la 5-HT exógena y endógena reducen la transmisión sináptica glutamatérgica a nivel postsináptico. B) La 5-HT exógena modula la transmisión sináptica glutamatérgica por activar a los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A}. C) El incremento de la 5-HT endógena causada por el citalopram reduce la transmisión sináptica glutamatérgica por activar a los receptores 5-HT_{1A}. D) Los resultados del presente estudio también nos brindan una explicación fisiológica de cómo actúan los fármacos antidepresivos como el citalopram, y que se administran en la clínica. Para el caso de la corteza auditiva, algunos estudios muestran que el incremento de la 5-HT endógena causada por el citalopram reduce la amplitud de los potenciales evocados auditivos en sujetos deprimidos ⁽¹⁰⁻¹¹⁾, esto posiblemente se debe a la reducción de la transmisión sináptica glutamatérgica mostrada en este estudio.

Marco teórico

Antecedentes

La corteza cerebral

La corteza cerebral es una estructura compleja en donde los distintos sistemas sensoriales se encuentran representados en áreas conocidas como áreas sensoriales primarias. Desde el sistema auditivo hasta el visual, cada modalidad sensorial posee un área cortical para su representación. Además de estas áreas sensoriales primarias, la corteza cerebral posee múltiples áreas de asociación y de función motora, que participan en la elaboración de diversas funciones como el aprendizaje, la memoria y el comportamiento ⁽¹⁵⁾, es decir, la corteza cerebral es la región específica del cerebro, que se encarga de procesar e interpretar la información sensorial, de planificar y organizar los diferentes estados conductuales ⁽¹⁶⁾. En la corteza cerebral de los humanos también convergen los mecanismos tanto estructurales como funcionales del lenguaje, la planeación, ejecución y otras funciones cognitivas que diferencian a los humanos de otros mamíferos ⁽¹⁷⁾.

Los estudios sobre la corteza cerebral iniciaron desde el año de 1869, con las contribuciones de Maynert y Von Gehirne, y por Betz en el año de 1874 ^(15,18). Estos autores establecieron las bases de que la corteza cerebral posee una organización celular organizada en capas. Para 1878, Bevan Lewis describió a la corteza cerebral, como un área que presenta una estratificación en capas (seis capas) ⁽¹⁵⁾. Posteriormente, para el año de 1911, Ramón y Cajal empleando el método de Golgi, describió de manera detallada la organización intrínseca de la corteza cerebral de los vertebrados y humanos incluyendo la estructura y las conexiones de los distintos tipos neuronales, su organización dendrítica y las fibras de entrada y salida que comunican a la corteza cerebral (para una revisión ver Valverde, 2002) ⁽¹⁵⁾.

Las seis capas principales de la corteza cerebral son: capa I o capa plexiforme externa; capas II y III que contienen un tipo de células llamadas piramidales pequeñas, capa IV o capa granular interna; capa V o ganglionar que contiene

neuronas piramidales grandes y, capa VI que contiene células en forma de huso (fusiformes). También, en cada una de estas capas se encuentran diferentes tipos neuronales. Por ejemplo, en la capa I se encuentran escasas células, siendo todas ellas interneuronas, además, se observan una gran cantidad de proyecciones dendríticas que provienen de las células piramidales de las capas inferiores; las capas II y III poseen neuronas piramidales de tamaño pequeño; la capa IV contiene principalmente neuronas estrelladas o neurogliformes; la capa V posee células piramidales grandes y la capa VI está conformada por variedades de células de forma irregular, polimorfas y fusiformes (para una revisión ver en Valverde, 2002)⁽¹⁵⁾.

Las distintas capas de la corteza cerebral de mamíferos poseen una amplia variedad de componentes celulares, sin embargo, de manera general, las neuronas presentes en la corteza cerebral se clasifican en dos tipos: en neuronas piramidales o neuronas excitadoras, que producen y liberan el ácido glutámico (neurotransmisor excitador en el sistema nervioso central) y, en neuronas no piramidales o interneuronas, las cuales son inhibitorias, ellas producen y liberan el ácido γ aminobutírico (GABA), principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central. Este tipo de interneuronas presenta una gran variabilidad y al menos en la corteza cerebral se han descrito 19 diferentes tipos de ellas.

Las células piramidales son células excitadoras y representan aproximadamente del 70-80% de la población neuronal⁽¹⁹⁾. Estas neuronas son más abundantes en las capas II-III, IV y V; el aspecto morfológico es similar a una pirámide y poseen un tallo dendrítico apical (dendrita apical) que inerva principalmente a la capa I de la corteza. Además, estas neuronas poseen una gran cantidad de dendritas basales con pequeñas protuberancias llamadas espinas dendríticas, en donde ocurren la mayoría de los contactos sinápticos con otras neuronas⁽¹⁵⁾. Diversas investigaciones reportaron que estas espinas dendríticas son estructuras muy plásticas, ya que presentan cambios estructurales y funcionales durante los procesos de aprendizaje y de memoria⁽²⁰⁻²⁴⁾.

El otro 20-30% de las células que conforma la corteza cerebral corresponde a las células inhibitoras o interneuronas ⁽²¹⁾. Este tipo de neuronas carecen de espinas dendríticas y son las únicas que se encuentran a lo largo de todas las capas de la corteza (I-VI) ⁽²⁵⁾. Las interneuronas de la corteza cerebral (neocorteza) tienen una morfología y funciones fisiológicas muy variadas ⁽²⁶⁻²⁷⁾.

En los últimos años se ha sugerido que, a nivel sensorial, el balance entre la excitación e inhibición es muy importante y cualquier anomalía o desbalance entre ellos puede dar origen a un gran número de patologías ⁽²⁸⁾. Un funcionamiento normal requiere, por lo tanto, de un equilibrio adecuado entre las influencias excitadoras e inhibitoras. Ambos tipos neuronales (células piramidales e interneuronas) establecen sinapsis entre sí, modulando su actividad a través de los neurotransmisores glutamato y GABA. Cualquier función cognoscitiva que se realice, es el resultado de la compleja interacción entre estos circuitos neuronales. Además de ello, no solo se requiere de la participación del sistema excitador (GLU) y del sistema inhibitor (GABA) en un circuito neuronal establecido, sino que se requiere de aferencias provenientes de otras áreas y que son necesarias para un funcionamiento adecuado. Entre estas aferencias se pueden mencionar las serotoninérgicas, provenientes de los núcleos del Rafe dorsal, las adrenérgicas (provenientes del *locus coeruleus* y las de acetilcolina, de los núcleos basales del cerebro, que en conjunto, modulan el flujo de información (GLU y GABA) a través de los circuitos neuronales cerebrales.

La corteza auditiva

Brodmann, ubicó la corteza auditiva humana en el lóbulo temporal en una zona llamada el giro de Heschl ⁽²⁹⁾. Los estímulos sonoros llegan al nervio auditivo y después a las células ciliadas, las cuales forman el ganglio espiral de Corti, las aproximadamente 40,000 neuronas de este núcleo mandan sus axones hacia los núcleos cocleares, que se dividen en dorsal y ventral ⁽³⁰⁾.

El núcleo olivar es el siguiente paso, algunas fibras del núcleo coclear dorsal no hacen sinapsis con el núcleo olivar, continúa ascendiendo y se encuentra con

la vía ventral que también asciende, ambas forman un tracto llamado lemnisco lateral. El lemnisco lateral conduce al colículo inferior, para luego dirigirse al cuerpo geniculado medial y por último al área primaria auditiva o A1⁽³⁰⁾. La vía auditiva tiene la característica de ser tonotópica ya que tiene un orden según la frecuencia que sus neuronas codifiquen⁽³¹⁾.

La corteza auditiva está dividida en seis láminas o capas horizontales que se orientan de manera paralela a la superficie. La corteza auditiva recibe aferencias glutamatérgicas de los núcleos intralaminares del tálamo (núcleo geniculado medial) que llevan la información sensorial del sistema auditivo⁽³²⁻³³⁾. Además, recibe información de otras áreas sensoriales, como la corteza visual y la somatosensorial, así como de las cortezas asociativas⁽³⁴⁻³⁵⁾. La información sensorial auditiva que proviene del tálamo es recibida en la corteza auditiva primaria, por las neuronas de la capa IV y estas a su vez envían dicha información hacia las capas II/III. Las capas (II-III) están compuestas de circuitos principalmente locales que forman conexiones recíprocas con las capas más profundas (V-VI) y tienen un papel determinante en el procesamiento e integración de la información sensorial que reciben. Las neuronas de las capas más profundas (V y VI) contienen proyecciones que conectan con otras áreas dentro de la corteza cerebral, así como proyecciones hacia estructuras subcorticales como la amígdala⁽³⁶⁾.

Aferencia glutamatérgica y conectividad de la corteza auditiva

El glutamato es el principal excitador en el sistema nervioso central, las corrientes glutamatérgicas median la transmisión de la información sensorial, motora, la generación de emociones, cognición e incluso intervienen en la formación de memoria. El glutamato ejerce sus acciones en el sistema nervioso central a través de sus receptores ionotrópicos (AMPA, NMDA y kainato) y metabotrópicos (mGlu1-8), los receptores ionotrópicos AMPA y NMDA que son permeables al sodio y al calcio, respectivamente, los cuales inducen a la generación de corrientes excitadoras postsinápticas, que producen la excitabilidad de los circuitos neuronales auditivos⁽³⁷⁻³⁸⁾.

Existe una aferencia glutamatérgica del tálamo, predominantemente del núcleo geniculado medial, hacia la corteza auditiva ⁽³⁹⁾. Una vez liberado, el glutamato activa a las neuronas piramidales de la capa IV y estas a su vez a las neuronas piramidales de las capas II/III ⁽⁴⁰⁾. También, la corteza auditiva recibe aferencias glutamatérgicas de otras áreas sensoriales como la visual. ⁽⁴¹⁻⁴²⁾ En un estudio realizado por Barbour y Callaway en el 2008 ⁽⁴³⁾, se muestran los patrones de conectividad de las neuronas piramidales de la corteza auditiva, especialmente, la conectividad de las neuronas piramidales de la capa II/III. Sus resultados indican que al estimular una neurona piramidal de las capas II/III, estas se pueden comunicar o establecer contactos sinápticos con otras neuronas piramidales de la misma capa, así como con neuronas de otras capas. Notablemente, en este artículo se reportó que la conectividad de una neurona piramidal de la capa II/III con otras neuronas piramidales se da en su mayoría, a no más de 200 micrómetros de distancia. Al mismo tiempo, estos autores reportan una alta conectividad entre las neuronas piramidales de la capa II/III con neuronas piramidales de las capas IV y V (figura 1 y 2)

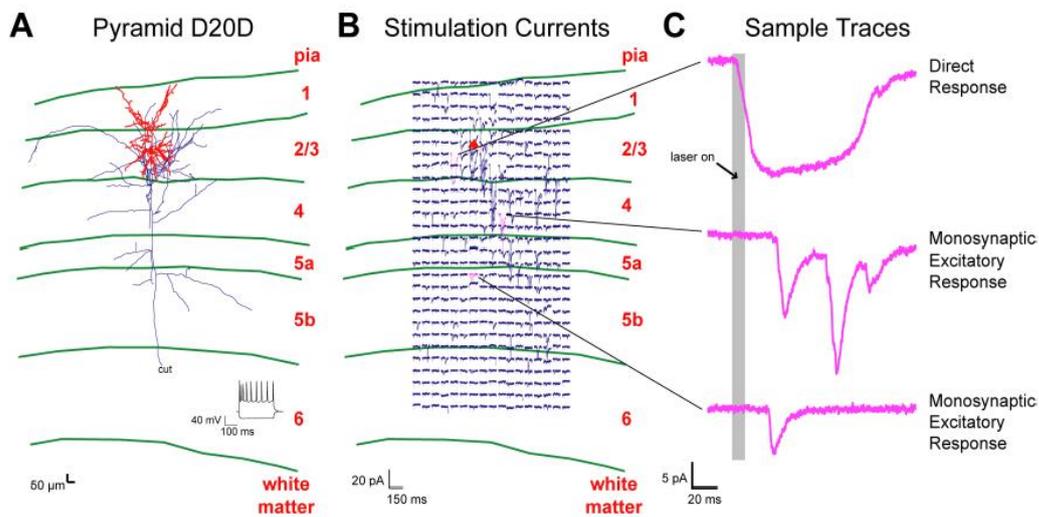


Figura 1. Patrones de conectividad en la corteza auditiva de la rata. A: neuronas piramidales de la capa II/III marcadas con biocitina. B: Estimulación de la neurona piramidal mostrada en la figura A y sus contactos sinápticos en cada una de las capas (I-VI de la corteza auditiva de la rata). C: Amplificación de las respuestas sinápticas mostradas en la figura 1B. Note que la estimulación de una neurona piramidal de la capa II/III induce corrientes sinápticas glutamatérgicas en otras neuronas localizadas en las capas IV y V de la corteza auditiva. Figura tomada de Barbour y Callaway, 2008.

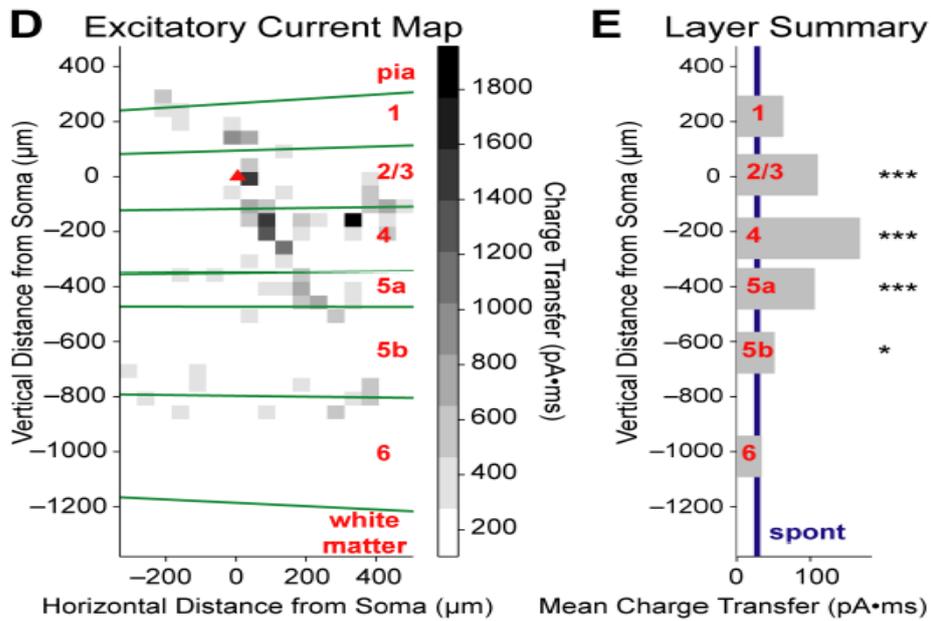


Figura 2. Conexiones sinápticas de las neuronas de la capa II/III de la corteza auditiva de la rata. D: En cuadros negros y grises se muestran los sitios de contacto de una neurona piramidal de la capa II/III de la corteza auditiva de la rata. Note que la mayoría de las conexiones sinápticas se encuentran a distancias no mayores de 200 micrómetros. E: Resumen mostrando que el mayor número de conexiones sinápticas de una neurona piramidal de la capa II/III ocurren en la misma capa. Figura tomada de Barbour y Callaway, 2008.

Por otro lado, la evidencia sugiere que en las primeras 3 semanas posnatales, las neuronas piramidales de las capas II/III de la corteza auditiva de rata presentan una maduración de sus espinas dendríticas lo cual es un indicativo de maduración fisiológica ⁽⁴⁴⁾. También se ha observado que, desde los 19 días postnatales, las propiedades intrínsecas como el potencial de membrana en reposo y la excitabilidad (disparo de potenciales de acción) de las neuronas piramidales de las capas II/III de la corteza auditiva de ratón son estables y permanecen sin cambios ⁽⁴⁵⁾. La excitabilidad (disparo neuronal) y corrientes sinápticas (sinapsis) de una neurona piramidal pueden ser moduladas por la activación de receptores metabotrópicos de neurotransmisores como la 5-HT ⁽⁴⁶⁾.

Serotonina en el sistema nervioso central

Los receptores de la 5-HT están formados por siete segmentos transmembranales hidrofóbicos con un terminal amino extracelular y un carboxilo intracelular⁽⁴⁷⁾. Se han identificado 14 tipos de receptores de la 5HT los cuales se agrupan en siete familias diferentes: 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ y 5-HT₇⁽⁴⁸⁻⁴⁹⁾. Solo el receptor 5-HT₃ pertenece a los receptores de ligando ionotrópicos, todos los demás pertenecen a la superfamilia de los receptores acoplados a proteína G. Estos juegan un papel clave en el reconocimiento y traducción no solo de señales como luz, olores, liberación de hormonas o de neurotransmisores, sino también, regulan la expresión de proteínas, controlan la actividad enzimática, la función de los canales iónicos, el transporte de vesículas, entre muchas otras funciones⁽⁴⁸⁾.

Un ejemplo de receptores metabotrópicos de la 5-HT son la familia 5-HT₁ que comprende de cinco tipos de receptores diferentes (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} y 5-HT_{1F}). El receptor 5-HT_{1A} activa a las proteínas G_{i/o} que inhiben la excitabilidad celular por activar canales de K⁺ e inhibir a canales de calcio y a la enzima adenilato ciclasa. Por otro lado, la familia de los 5-HT₂ tiene tres subtipos de receptores: 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C}. El receptor 5HT_{2A} se une a la proteína G_q y activa la fosfolipasa C (PLC) aumentando el inositol trifosfato (IP3), el diacilglicerol (DAG) y la actividad de la proteína cinasa C (PKC), la cual fosforila canales iónicos, lo que produce una excitación o inhibición de la actividad neuronal⁽⁴⁸⁻⁴⁹⁾.

En el cuadro 1 se enlistan cada uno de los receptores activados por la 5-HT y se mencionan sus principales agonistas, antagonistas y vías de señalización intracelular activadas.

Cuadro 1. Receptores de la 5-HT y sus vías de señalización intracelular.

Familia del receptor	Subtipos	Expresión en corteza	Agonistas	Antagonistas	Proteína G a la que se acopla	Acción
5-HT1	5-HT1A, 1B, 1D, 1E, 1F	5-HT1A 5-HT1B	(±)-8-OH-DPAT,	NAN-190	G _{i/o}	(-) adenilato ciclasa (+) canales de K ⁺ (-) canales de calcio.
5-HT2	5-HT2A, 2B, 2C	5-HT2A, 2C	(R)(-)-DOI	Ritanserina	G _q	(+) fosfolipasa C (+/-) canales iónicos (+/-) transmisión sináptica.
5-HT3		5-HT3		Tropisetron	No se acopla	Canal catiónico (Na ⁺ y Ca ²⁺)
5-HT4	5-HT4		Cisaprida, BIMU 8, RS 67506, ML 10302	GR 113808, SB 204070, SB 203186, RS 23597-190, RS 9604	G _s	(+) adenilato ciclasa
5-HT5	5-HT5A, 5B	5-HT5A			G _{i/o}	(+) canales leak GIRK
5-HT6				SB 271046	G _s	(+) adenilato ciclasa
5-HT7		5-HT7	5-MeOT, 8-OH-DPAT		G _s	(+) adenilato ciclasa

Liberación de serotonina

La transmisión sináptica para los neurotransmisores como el glutamato y el GABA consiste en la comunicación desde una fuente hacia un objetivo (terminal pre y post-sináptica) separados ambos por un espacio de transmisión o hendidura sináptica. Sin embargo, para los neurotransmisores como la 5-HT y las monoaminas, se ha descrito que la transmisión ocurre de forma extra-sináptica o por volumen, que se caracteriza por la difusión de químicos de manera constante, lenta e inespecífica ^(50,51). La 5-HT liberada en sitios extra-sinápticos, difunde en el medio extracelular a volúmenes diferentes, modulando a toda neurona que posea receptores de la 5-HT ⁽⁵²⁾. Los axones serotoninérgicos que inervan la corteza cerebral de la rata pueden dividirse en dos grupos: Axones de tipo M provenientes de los núcleos del Rafe medial, caracterizados por poseer grandes y esféricas varicosidades y axones tipo D, que inervan desde el Rafe dorsal y se caracterizan por pequeñas varicosidades granulares o fusiformes ⁽⁵³⁾.

Modulación de la liberación de 5HT

Una vez liberada la 5-HT, ésta puede actuar modulando la actividad de la misma neurona serotoninérgica a través de un auto-receptor, o bien, modulando la actividad de las neuronas postsinápticas (piramidales y/o interneuronas). Dicha modulación ocurre cuando la 5-HT liberada activa a alguno de sus receptores metabotrópicos (5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ y 5-HT₇), los cuales desencadenan diferentes vías de señalización intracelular para regular la actividad de los canales iónicos que participan en diversas funciones celulares. Como ejemplo, se puede mencionar la regulación del disparo de potenciales de acción o la liberación de algún neurotransmisor.

La liberación de la 5-HT puede regularse por varios mecanismos que se describen a continuación:

- A) Autorreceptores: Estos receptores están localizados en la terminal de donde se libera un tipo específico de neurotransmisor y regulan la liberación de estos ⁽⁵⁴⁾. Se ha visto que la activación de los receptores 5-

HT_{1A} , 5-HT_{1B} y 5-HT_{1D} inhiben la liberación de 5-HT en el núcleo de Rafe dorsal, la corteza prefrontal y el hipocampo ^(55,56,57), entre estos , uno de los más estudiados por ser potencial blanco farmacológico de tratamientos antidepresivos ⁽⁵⁸⁾, es el receptor 5-HT_{1A}, que se encuentra acoplado a proteínas Gi , y se expresa mayormente en la zona somatodendrítica de las neuronas serotoninérgicas, “auto-receptor” ⁽⁵⁹⁾.

Los receptores 5-HT_{1B} se encuentran en la terminal presináptica y su activación promueve la disminución de la liberación de la 5-HT ⁽⁶⁰⁾. Se ha estudiado el papel de los autorreceptores de la 5-HT en la corteza prefrontal, utilizando ratones transgénicos que no expresan el receptor 5-HT_{1B}. Los resultados indican que la concentración de 5-HT extracelular es modulada en ratones que expresan el receptor 5-HT_{1B} normalmente, en cambio, en el modelo transgénico que no expresa el receptor, se observa un aumento significativo de la concentración de 5-HT después de la administración de un inhibidor de la recaptura de 5-HT ⁽⁵⁶⁾.

También, el agonista del receptor 5-HT_{1B}, el CP-93,129, inhibe la liberación de 5-HT en la corteza frontal y el hipocampo ventral de la rata, sin embargo, en animales transgénicos no se muestran diferencias significativas en los niveles basales de liberación de la 5-HT, lo que indica la probable participación de otros subtipos de receptores de la 5-HT para compensar la falta del autoreceptor en el modelo transgénico ⁽⁵⁷⁾.

B) Transportadores de la 5-HT: La concentración de la 5-HT en la sinapsis es modulada por transportadores de membrana ubicados en la neurona presináptica que, recapturan a la 5-HT después de su liberación. Los transportadores usan un gradiente de concentración de Na⁺, Cl⁻, y K⁺ y un potencial de membrana interno negativo para ejercer su función ⁽⁶¹⁾. Los transportadores que recapturan selectivamente a la 5-HT, introducen esta última a las neuronas: 5-HT, Na⁺ y Cl⁻, y a su vez, también transportan el K⁺ hacia afuera de la célula ⁽⁶²⁾.

C) Monoamino-oxidasas: Después de la recaptura de la 5-HT, en el interior de la neurona existen enzimas que oxidan a las monoaminas, como, por ejemplo, la MAO A que oxida a la 5-HT, dopamina y norepinefrina en la corteza, hipocampo y estriado de rata ⁽⁶³⁾.

Concentración fisiológica de la 5-HT en el cerebro de la rata

Estudios de microdiálisis realizados en ratas han encontrado una concentración de 5-HT en el líquido cerebroespinal (LCE) de 0.5 a 2.0 nM en el hipocampo, la corteza frontal, el estriado y en los núcleos del Rafe ⁽⁶⁴⁾. Sin embargo, esta baja concentración de la 5-HT en el LCE no representa la verdadera concentración fisiológica, pues los transportadores de serotonina recapturan la mayor parte de esta después de la liberación. Las concentraciones de 5-HT en la sinapsis son mucho más altas llegando al orden de μM para poder activar a todos los receptores de la 5-HT ⁽⁶⁵⁾.

Por otro lado, utilizando la técnica de voltametría cíclica de escaneo rápido, algunos trabajos muestran que, al aplicar un estímulo eléctrico en el núcleo del Rafe dorsal de la rata, la concentración extra-sináptica de la 5-HT alcanza los 97 nM. Sin embargo, al aplicar 20 veces más el pulso a la misma intensidad, la concentración de la 5-HT alcanza los 2.0 μM , este cambio de nM a μM se dio muy rápido (menor a 5 segundos) ⁽⁶⁶⁾. En modelos *in vitro*, se ha encontrado que para activar a los receptores 5-HT_{1A} en rebanadas del núcleo de Rafe dorsal de ratas adultas, se necesitan concentraciones muy bajas en el orden de 1 nM ⁽⁶⁷⁾, pero los receptores 5-HT_{1A} postsinápticos, pueden activarse a concentraciones del orden μM en la corteza prefrontal de rata ⁽⁶⁸⁾ y, para los receptores con menor afinidad como el 5-HT_{2A}, se requieren concentraciones elevadas de hasta 100 μM ⁽⁶⁹⁾.

Acciones de la serotonina en la corteza auditiva

Por medio de estudios de inmunohistoquímica se ha encontrado que la mayor parte de la corteza cerebral de rata recibe inervación de axones serotoninérgicos mayormente en las capas I, II y III, debido a esta extensa y densa inervación se dice que el núcleo de rafe toca a cada célula de la corteza. ⁽⁷⁰⁾ Todas las áreas sensoriales primarias del cerebro de la rata reciben una gran inervación serotoninérgica a los 12 días postnatales y esta disminuye marcadamente al término del primer mes de desarrollo ⁽⁷¹⁾. La ontogenia de las proyecciones de las fibras serotoninérgicas en la rata puede ser dividida en tres períodos en días embrionarios: una fase inicial que incluye la elongación del axón (Días E12-16), el desarrollo de vías específicas (E15-19) y el desarrollo de los sitios terminales (días E19-PN21). La inervación de la corteza cerebral por las fibras serotoninérgicas constituye un proceso prolongado que se extiende desde los 19 días de la edad embrionaria (E19) hasta el día 21 de edad posnatal (PN21) ⁽⁵³⁾. En estas edades (PN21) existe una alta densidad de fibras serotoninérgicas en las capas I, II y III de la corteza auditiva de otros mamíferos ^(72, 73). Por otro lado, los receptores de la 5-HT se encuentran distribuidos ampliamente en toda la corteza cerebral, los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} se han encontrado expresados en las neuronas piramidales de las capas II/III de la corteza auditiva de la rata ^(13,74). Por ejemplo, Basura *et al.*, en el 2008 reportaron que la expresión de los receptores 5-HT_{2A} en la corteza auditiva de la rata, incrementa entre los días posnatales ocho al veintiuno. Posterior a estos días posnatales (PN28-35) los autores observaron una disminución en la expresión de estos receptores (figura 3).

Dado que la corteza auditiva recibe una inervación serotoninérgica y algunos de sus receptores se encuentran expresados en la corteza auditiva, es posible encontrar acciones moduladoras en la corteza auditiva de la rata. Éstas pueden manifestarse como la modulación de la frecuencia de disparo de potenciales de acción, la modulación de la liberación de algún neurotransmisor (como ejemplo, el neurotransmisor excitador glutamato), la modulación de receptores ionotrópicos (receptor–canal) y/o la modulación de canales iónicos que dependen del voltaje ⁽⁷⁵⁾

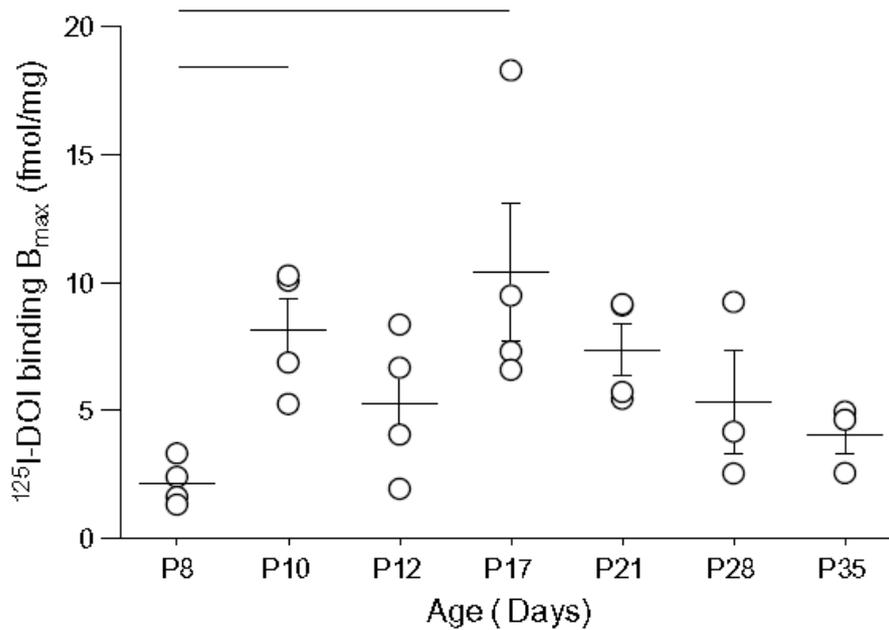


Figura 3. Expresión de los receptores 5-HT_{2A} en la corteza auditiva de la rata. La expresión del receptor 5-HT_{2A} en la corteza auditiva de rata cambia a lo largo de los primeros 35 días postnatales, incrementando entre los días 8-21 postnatales. Posteriormente existe una disminución en la expresión de los receptores 5-HT_{2A} entre los días postnatales 28-35 (tomado de Basura et al., 2008).

La 5-HT ha mostrado tener efectos moduladores sobre la transmisión sináptica excitadora en la corteza prefrontal medial, la corteza cingulada y la frontoparietal de roedores incrementando los potenciales excitadores postsinápticos y las corrientes excitadoras postsinápticas vía activación del receptor 5HT_{2A}⁽⁶⁹⁾. En ratas de edad postnatal (entre 6-31 días postnatales) la serotonina induce el disparo tónico de neuronas piramidales de la capa V de la corteza prefrontal⁽⁷⁶⁾. La serotonina también puede reducir corrientes de glutamato AMPA en neuronas piramidales en la corteza prefrontal de la rata postnatal (3-5 semanas)⁽⁷⁷⁾. Sin embargo, Deng y Lei (2007), mostraron que la serotonina incrementa las corrientes GABAérgicas espontáneas en la corteza entorhinal⁽⁷⁸⁾. Un resumen de las acciones serotoninérgicas en la corteza cerebral es mostrado en el cuadro 2.

Cuadro 2. Acciones moduladoras de la 5-HT y sus receptores en la corteza cerebral.

Artículo	Modelo animal	Zona	Efecto	 Excitación  Inhibición
Agahanian y Merck (1997) Registro intracelulares de actividad espontánea (72)	Rata(Adulta)	Capa V de la corteza medial prefrontal	Potenciales post sinápticos inducidos por 5HT(100µM)	
Zhang (2003) Registro intracelular (74)	Rata(juvenil)	Capa V de corteza pre límbica	La 5-HT (10µM) induce el disparo de neuronas piramidales de la capa V	
Cai <i>et al</i> (2002) Registro intracelular de corrientes espontáneas y miniatura (73)	Rata(Adulta)	Corteza prefrontal	La 5-HT reduce las corrientes AMPA de neuronas piramidales.	
Schmitz <i>et al</i> (1998) Registro intracelular de corrientes excitadoras en miniatura y con estímulo (75)	Rata(Adulta)	Corteza entorhinal medial	La 5-HT (10-20 µM) reduce las corrientes excitadoras	
Deng y Lei (2007) Registro de potenciales de acción (62)	Rata (juvenil)	Corteza entorhinal	La 5-HT reduce los potenciales de acción.	
Rao <i>et al</i> (2010) Registro de potenciales de acción (76)	Rata (Juvenil)	Corteza auditiva	La 5-HT (50µM) produce una disminución en la excitabilidad en corteza auditiva	
García-Oscos <i>et al</i> (2015) Registro intracelular (70)	Rata (Juvenil)	Corteza auditiva	La 5-HT(5µM) disminuye las corrientes GABAérgicas	

Otros estudios han mostrado que la frecuencia de los estímulos sensoriales, así como la modulación ejercida por diferentes neurotransmisores pueden reorganizar los campos receptivos, en los cuales se procesa la información sensorial ⁽⁷⁹⁻⁸⁰⁾. El papel de la 5-HT y sus receptores en la corteza auditiva no está claro. La mayoría de los estudios sobre la modulación de la transmisión sináptica por la 5-HT se ha concentrado en gran medida en la corteza

prefrontal y en la corteza sensorial-motora, en donde se ha demostrado que la aplicación de la 5-HT induce tanto la inhibición como la excitación de las neuronas corticales ⁽⁸¹⁻⁸²⁾.

Función de la serotonina en la corteza auditiva

Hasta el momento, muy poco se ha estudiado sobre la influencia de la 5-HT sobre la actividad sináptica excitadora en la corteza auditiva, la regulación específica de la actividad de la corteza auditiva por la activación de los receptores serotoninérgicos es en gran parte inexplorada. Existen varias evidencias de la función de la 5-HT en la corteza auditiva, como, por ejemplo, la depleción de triptófano, el aminoácido esencial precursor de la 5-HT, causa un retraso en el proceso de detección automática de los estímulos auditivos en la corteza auditiva de humanos ⁽⁸³⁾. También, diversos estudios reportan incrementos en la concentración de la 5-HT en la corteza cerebral auditiva de roedores durante sesiones de formación asociativa, en modelos animales de ansiedad y de comportamiento defensivo ⁽⁸⁴⁾. Por otro lado, se ha sugerido la participación de la 5-HT en la plasticidad auditiva producida por un condicionamiento auditivo del miedo, el cual incrementa el estrés e incrementa el nivel de la 5-HT cortical ⁽⁸⁵⁾.

En el caso del efecto de los antidepresivos en la corteza auditiva se ha encontrado que la modulación serotoninérgica mediada por el antidepresivo Sertralina reduce los potenciales evocados auditivos en personas sanas ⁽⁸⁶⁾. El tratamiento crónico con fluoxetina, otro inhibidor de la recaptura de serotonina usado para tratar la depresión ha mostrado tener efectos negativos en la plasticidad de la corteza auditiva al suprimir la potenciación sináptica a largo plazo en ratas adultas ⁽⁸⁷⁾.

Es de particular interés que los campos receptivos auditivos requieren del balance apropiado entre la excitación e inhibición en un circuito neuronal, por ello, se ha sugerido que el sistema serotoninérgico modula la transmisión sináptica, a través de producir cambios en los sistemas glutamatérgico y/o GABAérgico ⁽⁸⁸⁻⁸⁹⁾. El hecho de que la administración de sertralina y la

fluoxetina (inhibidores la recaptura de la serotonina) disminuyen el tamaño de los potenciales auditivos evocados sugiere que la serotonina podría reducir la transmisión sináptica excitadora (glutamato) o incrementar la transmisión sináptica inhibitoria (GABA). Hasta el momento existen pocos estudios realizados en la corteza auditiva que ayuden a explicar estos efectos.

Un estudio reporta que la serotonina reduce la frecuencia de disparo de potenciales de acción de las neuronas piramidales de la corteza auditiva ⁽¹²⁾. Otro estudio realizado por nuestro grupo de investigación, muestra que la serotonina inhibe la transmisión sináptica GABAérgica en ratas por activar a los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} ⁽¹³⁾. Además, este estudio menciona que la serotonina modula diferencialmente la transmisión sináptica GABAérgica durante el desarrollo posnatal, reduciendo la transmisión sináptica GABAérgica en etapas tempranas del desarrollo a través de la activación de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} e incrementando la transmisión sináptica GABAérgica en etapas juveniles-adultas a través de la activación de los receptores 5-HT₃. Sin embargo, se desconoce cómo puede ser afectada la transmisión sináptica glutamatérgica por la activación de los receptores serotoninérgicos, o más aún, cuando la liberación de la 5-HT sea incrementada como consecuencia de la ingesta de inhibidores de la recaptura selectivos de la serotonina (por aplicación del citalopram, fármaco administrado en la clínica a pacientes depresivos).

Por ello, en este trabajo se investigó la modulación serotoninérgica sobre la transmisión sináptica glutamatérgica en las capas II/III de la corteza auditiva de ratas juveniles (25-30 días). Para ello, se utilizó la técnica electrofisiológica de Patch clamp en célula completa en neuronas piramidales de rebanadas de cerebro de las capas II/III de la corteza auditiva de la rata. Mediante herramientas farmacológicas se estudió el efecto de la aplicación de la 5-HT y el citalopram, específicamente sobre la transmisión sináptica glutamatérgica

Planteamiento del problema

Dado que la serotonina tiene una amplia distribución de sus proyecciones en el sistema nervioso central y que participa en numerosas funciones fisiológicas entre las cuales se encuentran, la percepción sensorial y las funciones cognitivas como el aprendizaje y la memoria ⁽⁹⁰⁾, es de esperarse que la serotonina y sus receptores modulen la transmisión sináptica en la corteza auditiva de la rata. De hecho, se ha planteado que la serotonina tiene funciones importantes en el procesamiento e integración de la información sensorial a través de la modulación de los campos receptivos auditivos ⁽⁸⁵⁾, los cuales sufren modificaciones con el tratamiento antidepresivo.

Estos campos receptivos dependen del balance de excitación e inhibición en un circuito neuronal, por lo que se ha sugerido que el sistema serotoninérgico modula la actividad de los circuitos neuronales auditivos a través de producir cambios en la transmisión glutamatérgica y/o GABAérgica. Además, como se mencionó en el apartado de antecedentes, la administración de sertralina y la fluoxetina (inhibidores la recaptura de la serotonina) disminuyen la amplitud de los potenciales auditivos evocados y, nos sugiere que, el neurotransmisor 5-HT podría reducir la transmisión sináptica excitadora (glutamato) o el de incrementar la transmisión sináptica inhibitoria (GABA).

Hasta el momento se desconocen los mecanismos celulares por los cuales la 5-HT modula la transmisión sináptica glutamatérgica. El presente proyecto se inscribió dentro de esta línea de investigación y estuvo dirigido a estudiar el papel modulador de los receptores de la 5-HT, sobre la transmisión sináptica glutamatérgica en la capa II/III de la corteza auditiva de ratas juveniles de 25-30 días postnatales. En la figura 4 se muestra mediante un mapa conceptual los principales antecedentes y su relación con las preguntas de investigación.

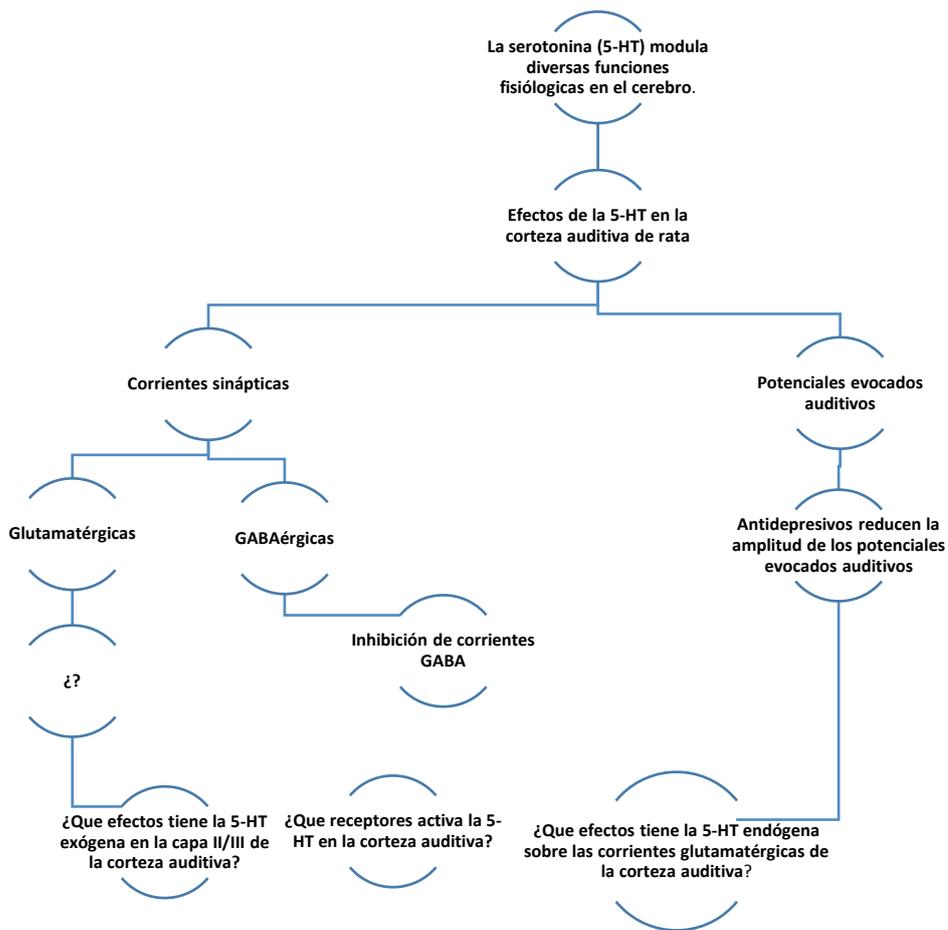


Figura 4. Resumen de antecedentes y las preguntas de investigación.

Pregunta de Investigación

¿La 5-HT y el fármaco citalopram reducen la transmisión sináptica glutamatérgica en las capas II/III de la corteza auditiva de la rata en la edad juvenil de 25-30 días?

Si esto es así ¿Qué tipo de receptor de la 5-HT reduce la actividad sináptica glutamatérgica en las capas II/III de la corteza auditiva de la rata?

Hipótesis

La serotonina y el citalopram reducirán la transmisión sináptica vía activación de los receptores 5-HT₁ y 5-HT₂. Si esto es así, el efecto observado se encontrará a nivel de la célula postsináptica.

Objetivo general

Evaluar los efectos *in vitro* de la 5-HT exógena y endógena e identificar los receptores que activa la 5HT para producir su efecto sobre la transmisión sináptica glutamatérgica en las capas II/III de la corteza auditiva de rata.

Objetivos específicos

1. Realizar una curva concentración–efecto de la 5-HT sobre la transmisión sináptica glutamatérgica.
2. Determinar los receptores que activa la serotonina para producir su efecto modulador en las capas II/III de la corteza auditiva de ratas juveniles, aplicando antagonistas y agonistas de receptores serotoninérgicos
3. Determinar si la aplicación del inhibidor de la recaptura (citalopram) modula las corrientes sinápticas glutamatérgicas de las capas II/III de la corteza auditiva.
4. Determinar sí la modulación producida por la 5-HT y el citalopram, se da en la célula postsináptica o presináptica.
5. Determinar si existen diferencias entre los efectos producidos por la serotonina exógena y la 5-HT endógena, causada por la inhibición de la recaptura de la 5-HT, sobre la transmisión sináptica glutamatérgica.

Materiales y Métodos.

Preparación

Se utilizó la preparación de rebanadas de cerebro de la corteza auditiva de ratas *Wistar* de edad juvenil (20-25 días) descrita previamente por Atzori *et al.*, (2005)⁽⁹⁴⁾, Salgado *et al.*, (2007)⁽⁹⁵⁾ y Salgado *et al.*, (2011)⁽⁹⁶⁾: Las ratas fueron anestesiadas con isofluorano (marca Baxter) y posteriormente decapitadas, se obtuvo el cerebro y se sumergió en una solución salina a 4°C, cuyo contenido será (en mM): 126 NaCl, 3 KCl, 1.5 MgCl₂, 1.5 CaCl₂, 25 NaHCO₃, y 11 glucosa (pH 7.4 con NaOH, 300 ± 5 mOsm/L; saturada con 95% O₂ y 5% CO₂). Se usó un vibratomo (Ted Pella, Reading CA) para obtener rebanadas cerebrales de 270µM de espesor, correspondientes a la corteza auditiva. Para ubicar la corteza auditiva se utilizaron las coordenadas estereotáxicas del cerebro de rata de Paxinos y Watson (2007)⁹⁷, tomando como referencia la posición del hipocampo y la fisura rinal como lo muestra la figura 5.

Las rebanadas se sumergieron en la misma solución fisiológica (mencionada anteriormente), cuando menos una hora antes de proceder a realizar los registros electrofisiológicos, a una temperatura de 30°C.

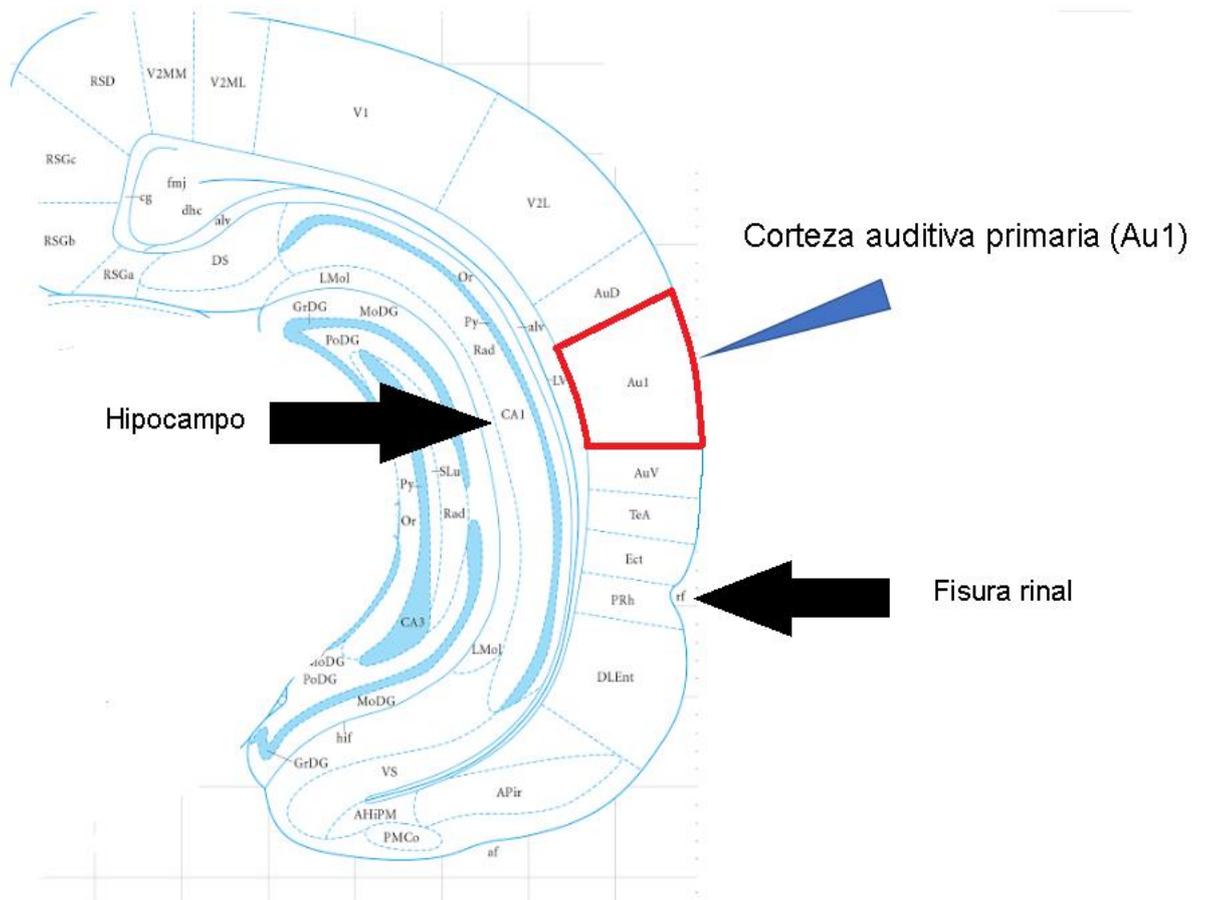


Figura 5. Corte coronal de cerebro de rata. Se muestra la posición de la corteza auditiva primaria en rojo (Modificada de Paxinos y Watson, 2007).

Registros electrofisiológicos

Para el registro electrofisiológico, las rebanadas se mantuvieron en una cámara de inmersión o registro donde las células piramidales de las capas II/III se visualizaron por medio de un microscopio de la marca Olympus BX61 con filtro infrarrojo y con la óptica de contraste diferencial. Las neuronas se seleccionaron de forma visual por su forma piramidal y por su dendrita apical pronunciada.⁷⁴ Los registros electrofisiológicos se realizaron usando microelectrodos de vidrio de borosilicato, fabricados por un “estirador” de pipetas (Sutter Instruments P97), ajustado para que los micro-electrodos tuvieran una resistencia de 3-5 MΩ en el baño (solución fisiológica).

Los electrodos se llenaron con una solución denominada intracelular, cuyo contenido es (en mM): 110 gluconato de potasio, 10 de cloruro de potasio, 0.5 de EGTA, 1 lidocaína N-etilbromuro (QX-314) para evitar el disparo de potenciales de acción en la neurona registrada, 1 MgCl₂, 10 ácido 4-(2-Hidroxietil) piperazina-1-etanosulfónico (HEPES), 1.5 de adenosina trifosfato de magnesio (ATPMg₂), 20 de fosfocreatina. La solución se ajustó a un pH de 7.3 y una osmolaridad de 275 ± 5 mOsm/L⁽⁹⁸⁾.

Los registros se realizaron bajo la configuración de “célula completa” (whole cell, Patch clamp por sus siglas en inglés), en la modalidad de fijación de voltaje, para ello se utilizó un amplificador (Multiclamp 700B, Axon Instruments). La resistencia de acceso fue monitoreada aplicando un pulso de voltaje de -2 mV a lo largo de los experimentos. No se aceptaron experimentos en donde se modificó la resistencia de entrada de las células en más del 20%.

Los registros se digitalizaron y almacenaron en un disco duro de una computadora de escritorio, la cual recibió los datos de los registros de una interface analógica/digital, Digidata 1440 (Axon Instruments). La frecuencia de adquisición de los datos fue de 10 KHz, para ello se utilizó el programa clamp fit versión 10.5 (Axon Instruments). Para estimular a las neuronas piramidales de la corteza auditiva se utilizó un electrodo monopolar hecho de vidrio de borosilicato y se llenó con la misma solución fisiológica (extracelular) donde se incubaron las rebanadas de cerebro. Estos electrodos se acoplaron a una unidad de aislamiento (A365, WPI), la cual envió pulsos de corriente de 10 hasta 50 pA y con una duración de 180 ms. Estos electrodos de estimulación se colocaron a no más de 200 micrómetros de la neurona de registro (figura 6).

Para estudiar la transmisión sináptica glutamatérgica, a la solución intracelular se le añadió picrotoxina a una concentración de 2 mM⁽⁸⁰⁾ esto para bloquear los receptores del ácido γ aminobutírico (GABA). Con la finalidad de corroborar que solo se registraron corrientes sinápticas glutamatérgicas, en algunos experimentos, se colocó en la solución de registro (solución fisiológica) el DNQX (10 μ M) y el ácido kinurénico (2mM), los cuales son antagonistas selectivos de los receptores AMPA y NMDA, respectivamente.

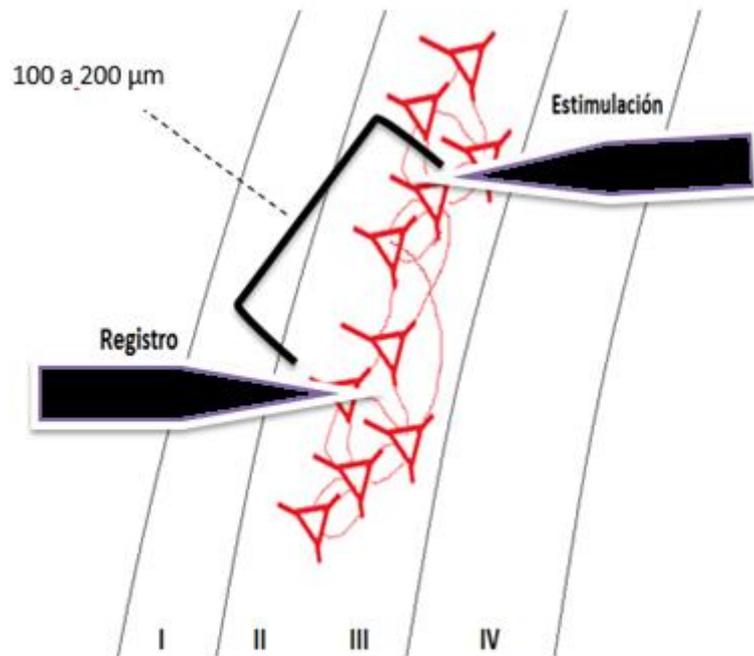


Figura 6. Registro y estimulación en rebanada. Posición de los electrodos de registro y estimulación en la capa II/III de la corteza auditiva, en rojo se representan las neuronas piramidales.

Técnica de pulso pareado

Para estudiar las corrientes postsinápticas excitadoras (CPSEs), o corrientes sinápticas glutamatérgicas, se utilizó el protocolo de pulso pareado (Figura 7), el cual consistió en la aplicación de dos estímulos eléctricos idénticos (duración: 180 μs , intensidad: 10-50 μA), los cuales se separaron por un intervalo de 50 ms y se repitieron cada diez segundos con los electrodos de estimulación anteriormente descritos. La aplicación de cada uno de estos estímulos eléctricos pareados permite registrar la amplitud de dos corrientes sinápticas. Aun cuando los estímulos son idénticos, en este protocolo, la amplitud de las corrientes sinápticas varía. La relación entre las amplitudes de los dos sinápticos que se producen por la estimulación eléctrica (relación

S_2/S_1), se usó como un índice del estado de la probabilidad de la liberación del neurotransmisor glutamato.

De acuerdo con la teoría del Ca^{2+} residual postulada por Katz y Miledi (1968), cuando la CPSE inducida por el segundo pulso eléctrico fue mayor que la inducida por el primer estímulo, se le denominó como facilitación por pulsos pareados (sigla PPF, del inglés “*Paired Pulse Facilitation*”); en caso contrario, recibió la denominación de depresión por pulsos pareados (sigla PPD, del inglés “*Paired Pulse Depression*”). De tal forma que, cuando un neurotransmisor (5-HT, por ejemplo) produce una facilitación por pulsos pareados, se infiere que la probabilidad de liberación del neurotransmisor glutamato se redujo y generalmente es aceptado como una evidencia de inhibición presináptica. Mediante esta técnica se estudió el efecto de la 5-HT y el citalopram sobre la transmisión sináptica glutamatérgica. En este estudio también se examinó: ¿Cuáles son los receptores de la 5-HT involucrados en la modulación de la transmisión sináptica glutamatérgica?, para ello se registraron neuronas piramidales de las capas II/III de la corteza auditiva (como se mencionó anteriormente).

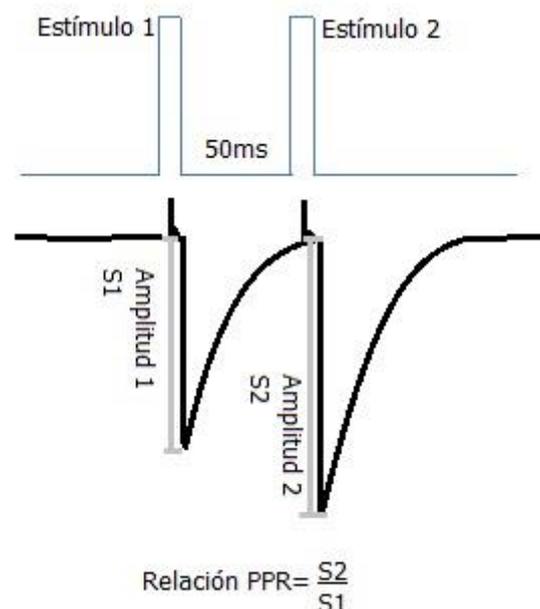


Figura 7. **Esquema representativo de la técnica de pulso pareado.** Se observa cómo se midió la amplitud de las corrientes sinápticas generadas por los dos pulsos. El nivel basal se tomó posterior al artefacto del estímulo y se midió la corriente al pico en picoamperios (pA) (Tomada de Torres-Ramírez, 2015).

Diseño experimental

Con la finalidad de caracterizar el efecto de la 5-HT y el citalopram sobre la transmisión sináptica glutamatérgica, se obtuvieron las amplitudes, medidas en picoamperios (pA), de las CPSEs aisladas farmacológicamente con picrotoxina (1 mM), para bloquear la transmisión sináptica GABAérgica; estas corrientes fueron inducidas por medio de una estimulación eléctrica con el protocolo de pulso pareado (anteriormente descrito).

Para determinar dicho efecto, primeramente, se realizó una curva dosis-respuesta de la 5-HT, utilizando concentraciones del orden nanomolar hasta micromolar: 100 nM, 500 nM, 1 μ M, 5 μ M y 10 μ M con el fin de conocer la concentración a la cual este neurotransmisor produce su efecto máximo sobre las corrientes sinápticas glutamatérgicas que se registraron en una neurona piramidal de las capas II/III de la corteza auditiva. Para ello, se midió la amplitud de la primera corriente generada por el primer estímulo eléctrico bajo tres condiciones experimentales diferentes:

1. En condiciones control, en ausencia de la 5-HT (se registraron las corrientes sinápticas durante 5 minutos para establecer las condiciones iniciales del experimento, línea basal) (ver figura 8).
2. Posteriormente se aplicó la 5-HT, el tiempo de su aplicación se determinó con base a la observación del efecto máximo de la serotonina a una concentración de 10 μ M. Para cada una de las células que se registraron, solo se aplicó una concentración de serotonina.

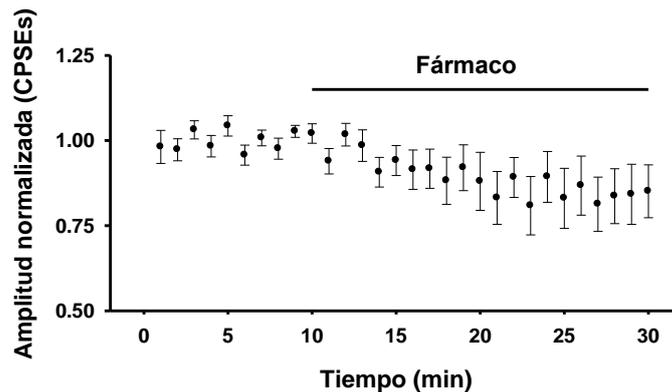


Figura 8. Representación del curso temporal de un experimento. Se registraron las CPSEs durante 10 minutos en condiciones control y posteriormente se aplicó separadamente la serotonina, el citalopram y/o los agonistas y antagonistas de los receptores de la 5-HT. Los efectos de los fármacos se registraron por 20 minutos, esto se le hizo a cada neurona piramidal registrada, cada círculo corresponde a la amplitud promedio de 6 CPSEs (1 min) en $\mu A \pm$ el error estándar.

Para comparar el efecto de los fármacos empleados (5-HT, citalopram y agonistas de los receptores de la 5-HT) con respecto a las condiciones control y de lavado, se tomaron las amplitudes al pico de la primera corriente sináptica durante los 5 minutos de registro en condiciones control y los últimos 5 minutos de la aplicación de la 5-HT o citalopram (o los respectivos agonistas o antagonistas de los receptores de la 5-HT)

Con los datos que se obtuvieron, se realizó una curva concentración-efecto y mediante su ajuste, con la ecuación de Hill, se determinó la concentración a la cual la 5-HT produjo la respuesta máxima y la concentración efectiva media (50% de la respuesta máxima). Para los experimentos posteriores, se usó la concentración máxima o saturante de la 5-HT. Para caracterizar el efecto de la 5-HT sobre la transmisión sináptica GABAérgica y determinar si la acción de este neurotransmisor es a nivel presináptico y/o postsináptico, se midió el cociente entre las amplitudes de las dos corrientes sinápticas excitadoras que se obtuvieron por ambos pulsos (relación S2/S1). Este cociente se usó como un índice de la probabilidad de la liberación del neurotransmisor, anteriormente descrito.

Para la identificación de los receptores de la 5-HT que participaron en la modulación de la transmisión sináptica glutamatérgica se hicieron registros en presencia de los siguientes agonistas y antagonistas:

- Bromhidrato de (\pm)-8-Hidroxi-2-(dipropilamino) tretalina, [(\pm)-8-OH-DPAT], agonista selectivo de los receptores 5-HT₁ con alta afinidad al receptor subtipo 5-HT_{1A}, y el NAN-190 que es un antagonista selectivo de los receptores de serotonina del subtipo 5-HT_{1A}.
- Clorhidrato de (R)-(-)-DOI, potente y selectivo agonista de los receptores 5-HT_{2A}. Ritanserina, potente antagonista de los receptores 5-HT_{2A}.

Procesamiento de datos (estadística a aplicar) y presentación de resultados

La línea basal, se determinó estadísticamente, para ello se midió la amplitud de las corrientes sinápticas glutamatérgicas dadas en respuesta al primer estímulo eléctrico, para ello se promedió cada una de las corrientes sinápticas en lapsos de un minuto de registro (6 corrientes sinápticas por minuto, 5 minutos totales para la obtención de la línea de base o situación control); para ello, se utilizó la prueba de análisis de varianza de medidas repetidas.

Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media. La curva dosis-respuesta se ajustó mediante la ecuación de Hill: $I = I_{max} \times \{1 / [1 + (CE_{50} / [ligando])^n]\}$, donde la I_{max} es la respuesta máxima, n es el coeficiente de Hill y CE_{50} como la concentración necesaria para producir el 50% de la respuesta máxima. Para considerar si los efectos causados por la 5-HT, el citalopram y los agonistas y antagonistas específicos de los receptores de la 5-HT se utilizó la prueba de Student's t-test.

La relación del pulso pareado (RPP) se calculó como la media de la amplitud de la corriente al segundo pulso dividido por la media de la amplitud de la corriente al primer pulso (figura 8) y la significancia estadística de la aplicación de los agonistas y antagonistas serotoninérgicos se obtuvieron por medio de la

prueba de *t* de Student de tipo pareada, previa comprobación de que los datos se comportan normalmente (Shapiro-Wilk *normality test*).

Grupos experimentales

Efectos de la serotonina sobre las corrientes glutamatérgicas e identificación del sitio de acción en la sinapsis:

- Serotonina (5HT) a las concentraciones 100 nM, 500 nM, 1 μ M, 5 μ M y 10 μ M

Comparación con los efectos de la serotonina endógena

- Citalopram a 1 μ M

Identificación de receptores serotoninérgicos:

- 8-OH-DPAT, agonista del receptor 5HT_{1A}.
- 8-OH-DPAT y NAN-190, antagonista del receptor 5HT_{1A}.
- DOI, agonista del receptor 5HT_{2A}.
- DOI y Ritanserina antagonista del receptor 5HT_{2A}.

Consideraciones éticas

Los procedimientos mencionados en este protocolo de tesis se llevaron a cabo de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana para el cuidado y uso de animales de laboratorio para investigación (NOM-062-ZOO-1999).

Resultados

Los resultados que a continuación se presentan fueron obtenidos en neuronas piramidales de las capas II/III de rebanadas de la corteza cerebral auditiva de

ratas juveniles. Los registros de la transmisión sináptica glutamatérgica se realizaron mediante la técnica de fijación de voltaje en célula completa. Para estudiar la influencia de la 5-HT exógena y endógena sobre la transmisión sináptica glutamatérgica, se aislaron farmacológicamente las corrientes sinápticas glutamatérgicas. Para ello, todos los experimentos se realizaron en presencia de los bloqueadores de los canales ionotrópicos GABAA (Picrotoxina 2 mM). Bajo estas condiciones experimentales se observó que la estimulación por el protocolo de pulsos pareados generó corrientes sinápticas en la célula piramidal registrada, las cuales fueron sensibles al bloqueador de los receptores AMPA (DNQX 10 μ M), el cual bloqueó completamente las corrientes sinápticas.

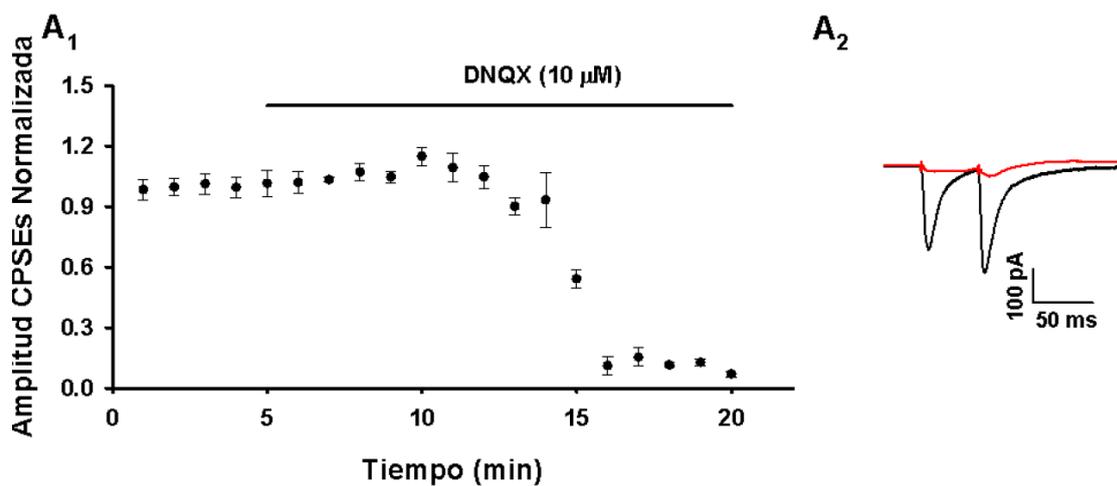


Figura 9. Aislamiento farmacológico de las corrientes postsinápticas excitadoras. A1. Se muestra el curso temporal del experimento antes y después de la aplicación del DNQX (10 μ M, n=3). Se promediaron los efectos del DNQX sobre las amplitudes de la primera corriente sináptica glutamatérgica en 3 células registradas. Cada circulo representa la amplitud promedio de 6 CPSEs, equivalentes a un minuto de registro \pm el error estándar. A2. Se muestran trazos representativos de las corrientes sinápticas glutamatérgicas en control (negro) y después de la aplicación del DNQX (rojo).

La aplicación de 1, 5 y 10 μ M de la 5-HT exógena disminuye las CPSEs a nivel post sináptico

Una vez aisladas las corrientes sinápticas glutamatérgicas se procedió a estudiar la modulación de la transmisión sináptica glutamatérgica por la 5-HT. Primeramente, se realizó una curva concentración-efecto de la 5-HT sobre las corrientes sinápticas glutamatérgicas en las capas II/III de la corteza auditiva de ratas juveniles. Como se puede observar en la figura 10, la aplicación de 100 nM de la 5-HT, no mostró un efecto estadísticamente significativo (N.S) sobre las amplitudes de las CPSEs, de 78.95 ± 1.93 pA en condiciones control a 82.54 ± 1.47 pA ($n=5$, $p=0.178$, prueba de t pareada).

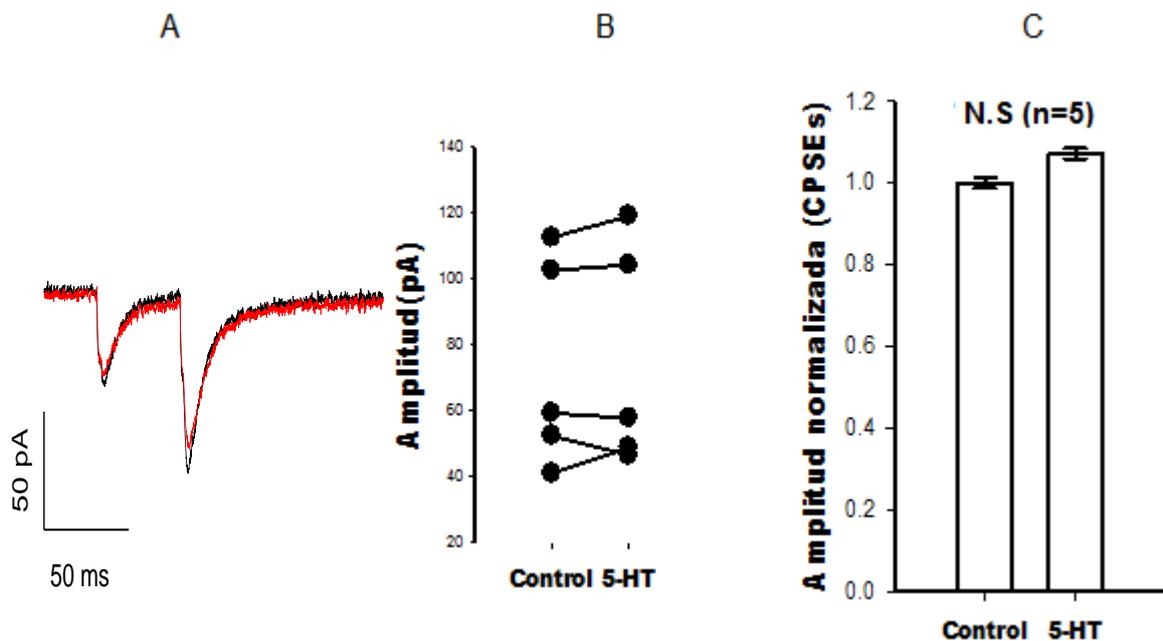


Figura 10. Efecto de la 5-HT (100 nM) sobre las corrientes sinápticas glutamatérgicas en la capa II/III de la corteza auditiva de la rata. A: Trazos representativos de una CPSE en condiciones control (negro) y en presencia de la 5-HT (rojo) B: Amplitud de los CPSEs de células individuales ($n=5$) C: Amplitudes normalizadas (media \pm error estándar) antes y después de la aplicación de la 5-HT a una concentración de 100nM ($n=5$ neuronas registradas, $p=0.178$, prueba de t pareada).

En la figura 11 se muestra que la relación de pulso pareado (RPP) no cambió después de la aplicación de la 5-HT (100 nM), de 1.47 ± 0.06 en condiciones

control a 1.43 ± 0.06 en presencia de la 5-HT ($n=5$, $p= 0.691$, prueba de t pareada).

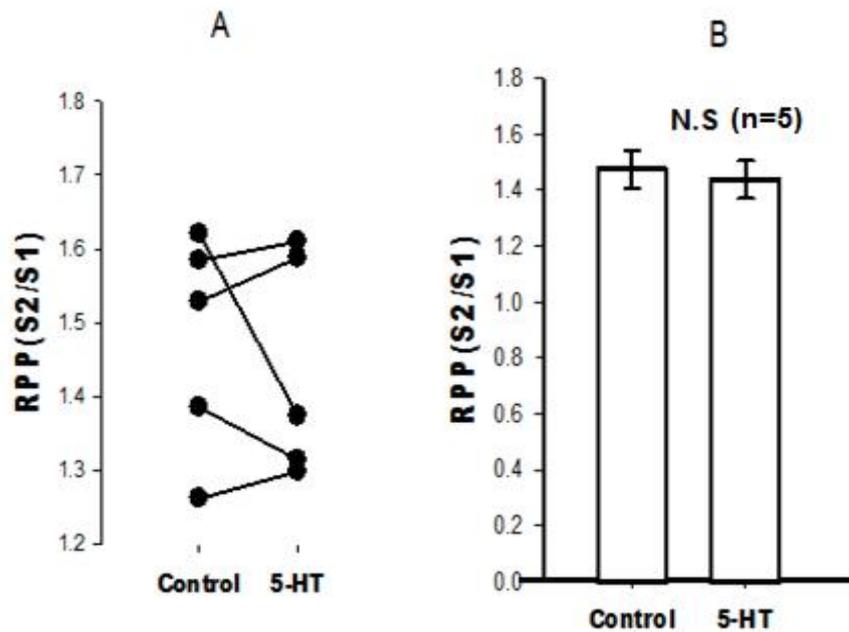


Figura 11. Efecto de la aplicación de 100nM de la 5-HT sobre la relación de pulso pareado (RPP). A: Efectos de la aplicación de 5-HT en el RPP de células individuales ($n=5$). B: Resumen del efecto de la 5-HT sobre el RPP (media \pm error estándar). La 5-HT a 100nM no produjo cambios en la RPP ($n=5$, $p= 0.691$, prueba de t pareada).

Para la aplicación de la 5-HT a una concentración de 500 nM no se observó un efecto estadísticamente significativo sobre la amplitud de las CPSEs, de 82.4 ± 1.2 pA en condiciones control a 77.0 ± 1.4 pA en presencia de la 5-HT ($n=6$, $p=0.140$, prueba t pareada). En la figura 12A se presentan trazos representativos obtenidos de una célula en condiciones control y en presencia de la 5-HT (500 nM). En la figura 12B se muestra el efecto de la aplicación de la 5-HT (500 nM) en cada célula registrada sobre la amplitud de las corrientes sinápticas glutamatérgicas. El resumen del efecto de la aplicación de la 5-HT sobre las CPSEs se muestra en la figura 12C. En la figura 13 se muestra que la relación de pulso pareado fue de 1.63 ± 0.09 en control. Al aplicar la 5-HT (500nM) en el baño, la relación de pulso pareado fue de 1.57 ± 0.10 ($n=6$, $p=0.701$, prueba t pareada).

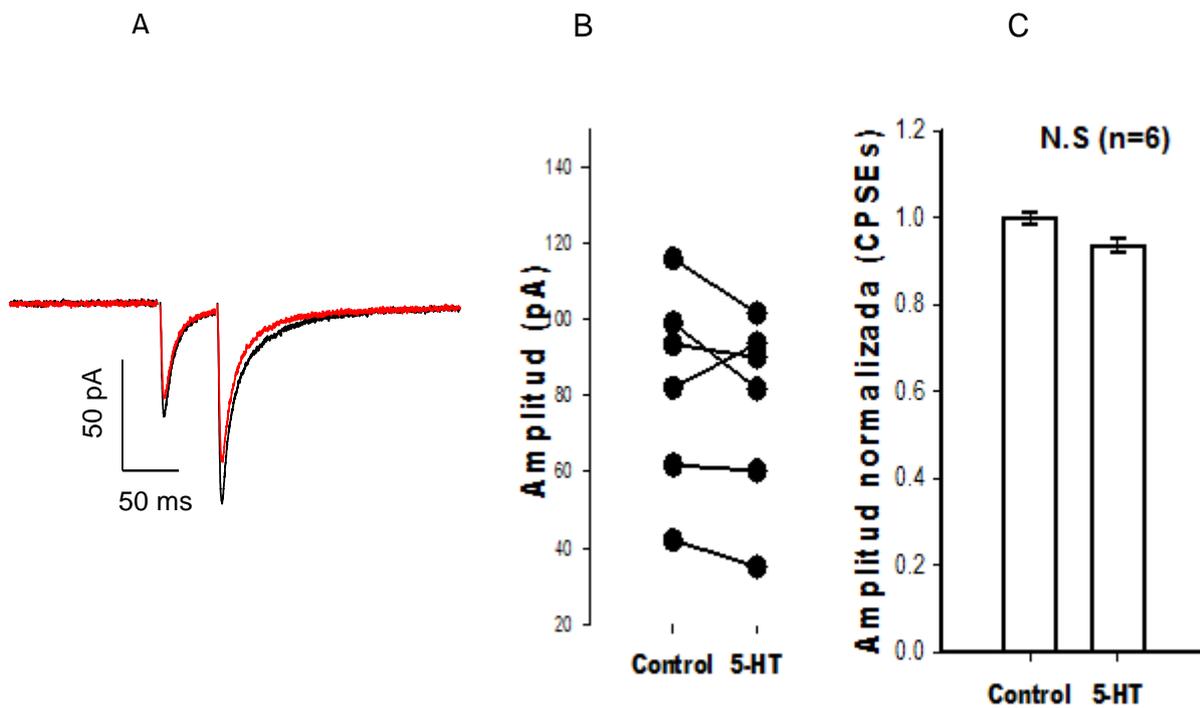


Figura 12. Efecto de la 5-HT (500 nM) sobre las corrientes sinápticas glutamatérgicas en la capa II/III de la corteza auditiva de la rata. A: Trazos representativos en condiciones control (negro) y aplicando la 5-HT (rojo) a una concentración de 500 nM. B: Amplitud de las CPSEs en células individuales (pA). C: Amplitudes normalizadas (media \pm error estándar), la aplicación de la 5-HT a 500nM no produjo cambios estadísticamente significativos (N.S) sobre la amplitud de las CPSEs, (n=6, $p=0.140$, prueba de *t* pareada).

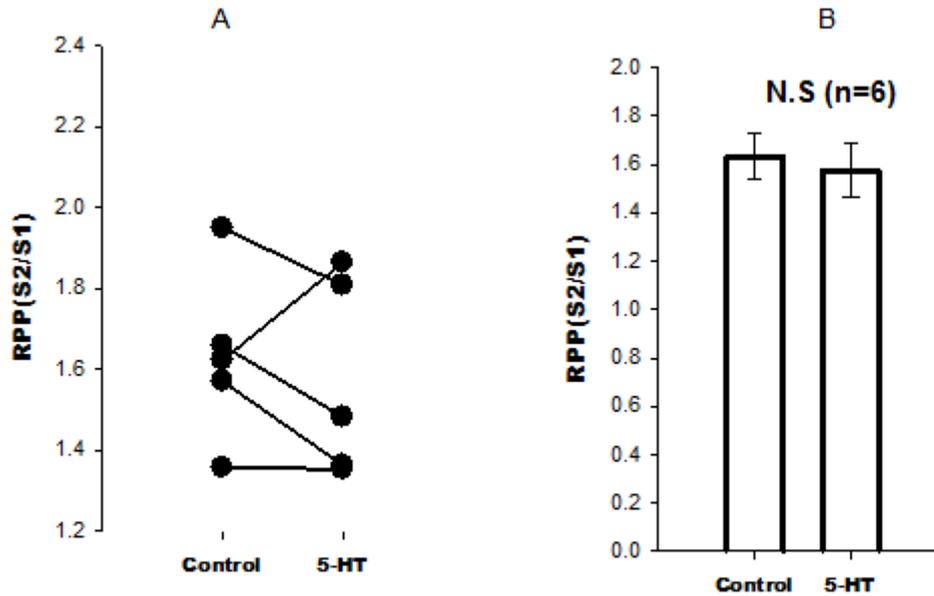


Figura 13. Efecto de la aplicación de 500 nM de la 5-HT sobre la relación de pulso pareado (RPP). A: Se muestra la RPP en células individuales antes y después de la aplicación de la 5-HT (500 nM). B: Resumen del efecto de la 5-HT sobre el RPR. No se observaron cambios en la RPP), (n=6, p=0.701, prueba de *t* pareada)

La aplicación de la 5-HT a una concentración de 1 μ M causó una reducción del $15.2 \pm 2.5\%$ en la amplitud de las CPSEs, de 80.7 ± 1.1 pA en condiciones control a 68.5 ± 0.7 pA (n=6, p=<0.001, prueba *t* pareada). En la figura 14A se presentan trazos representativos obtenidos de una célula en condiciones control y en presencia de la 5-HT (1 μ M). En la figura 14B se muestra el efecto de la aplicación de la 5-HT (1 μ M) en cada célula registrada sobre la amplitud de las corrientes sinápticas glutamatérgicas. El resumen del efecto de la aplicación de la 5-HT (1 μ M) sobre las CPSEs se muestra en la figura 14C. En la figura 15A se muestra la RPP en células individuales. En condiciones control, la RPP fue de 1.49 ± 0.10 . Al aplicar 1 μ M de la 5-HT en el baño, la relación de pulso pareado fue de 1.50 ± 0.04 . No se encontró diferencia estadísticamente significativa en el RPP (n=6, p=0.365, prueba *t* pareada).

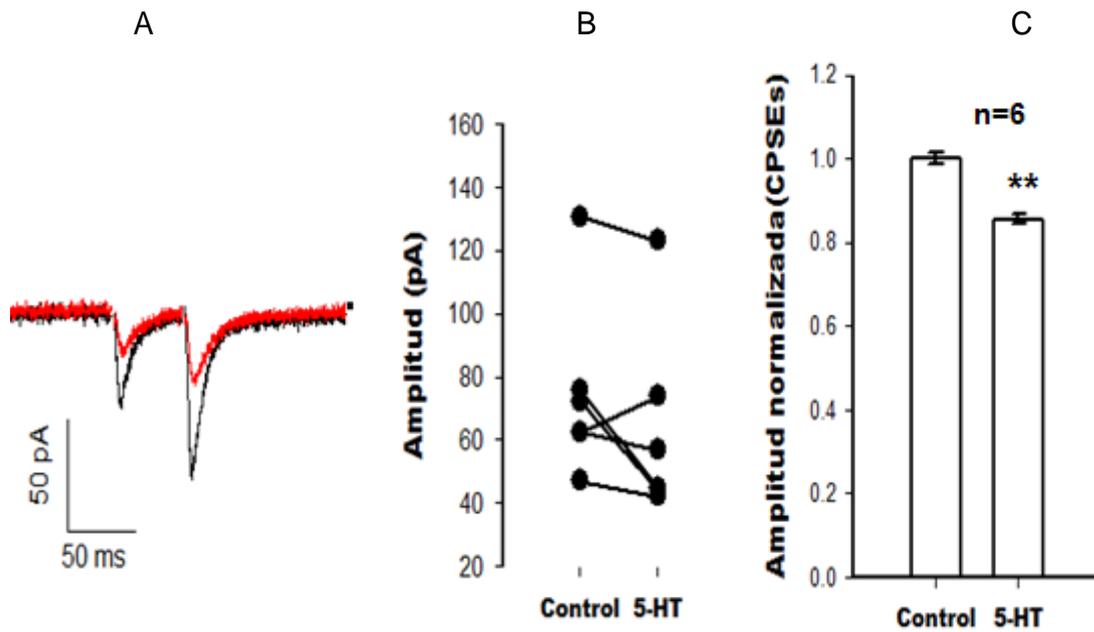


Figura 14. Efecto de la 5-HT (1 μ M) sobre las corrientes sinápticas glutamatérgicas en la capa II/III de la corteza auditiva de la rata. A: Trazos representativos en condiciones control (en color negro) y después de la aplicación de la 5-HT (en color rojo) registrados en una neurona piramidal de la capa II/III de la corteza auditiva. B: Amplitud de las CPSEs en control y después de aplicar 5-HT a (1 μ M) en células individuales. C: Gráfica de barras mostrando las amplitudes normalizadas de las CPSEs (media \pm error estándar), antes y después de aplicar la 5-HT (n=6, p<0.001, prueba de t pareada).

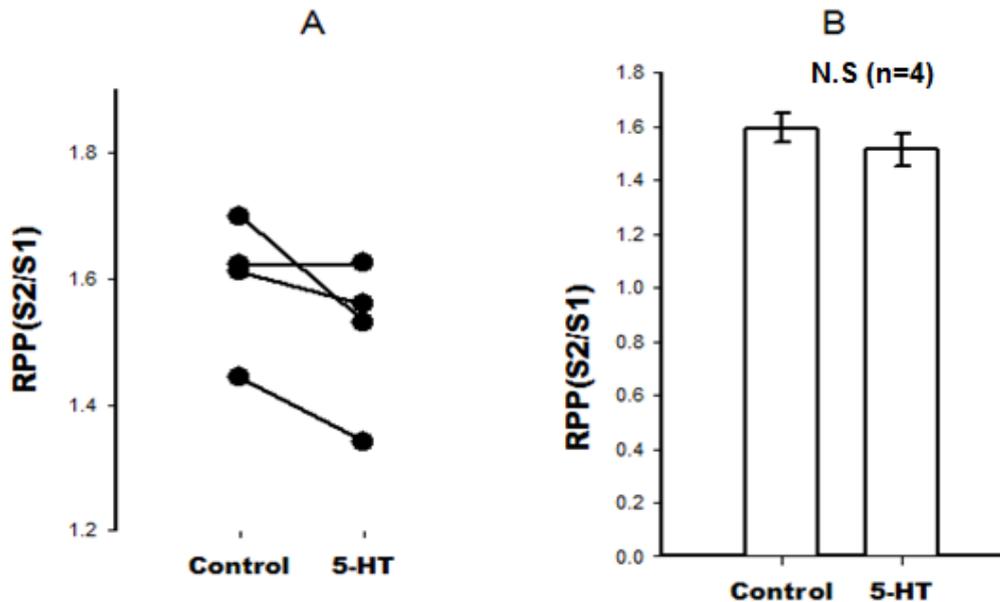


Figura 15. Efecto de la aplicación de 1 μM de la 5-HT sobre la relación de pulso pareado (RPP). A: Se muestra la RPP en células individuales antes y después de aplicar la 5-HT (1 μM) B: Se muestra el resumen de las acciones de la 5-HT sobre la RPP en 6 células registradas (media \pm error estándar). Note que la aplicación de la 5-HT no cambió la RPP ($p=0.365$).

La aplicación de la 5-HT (5 μM) provocó una reducción de las CPSEs del $27.9 \pm 4\%$, de 134.15 ± 0.73 pA en condiciones control a 93.11 ± 0.83 pA en presencia de la 5-HT (Figura 16, $n=8$, $p=0.008$, prueba t pareada), La figura 16A muestra el curso temporal de las amplitudes de las CPSEs antes y durante la aplicación de la 5-HT (5 μM) ($n=8$, $p=0.008$, prueba t pareada). La figura 16B muestra el resumen de la aplicación de la 5-HT sobre la amplitud de las CPSEs en la capa II/III de la corteza auditiva de la rata. La figura 16C muestra el curso temporal de las amplitudes normalizadas de las CPSEs antes y durante la aplicación de la 5-HT ($n=8$, $p=0.008$, prueba t pareada). La figura 16D muestra el resumen de la aplicación de la 5-HT sobre la amplitud de las CPSEs. En la figura 17 se muestra que en condiciones control la RPP fue de 1.54 ± 0.05 y en presencia de 5 μM de la 5-HT fue de 1.55 ± 0.06 ($n=8$). No se

encontraron diferencias significativas en el RPP ($n=5$, $p=0.883$, prueba t pareada).

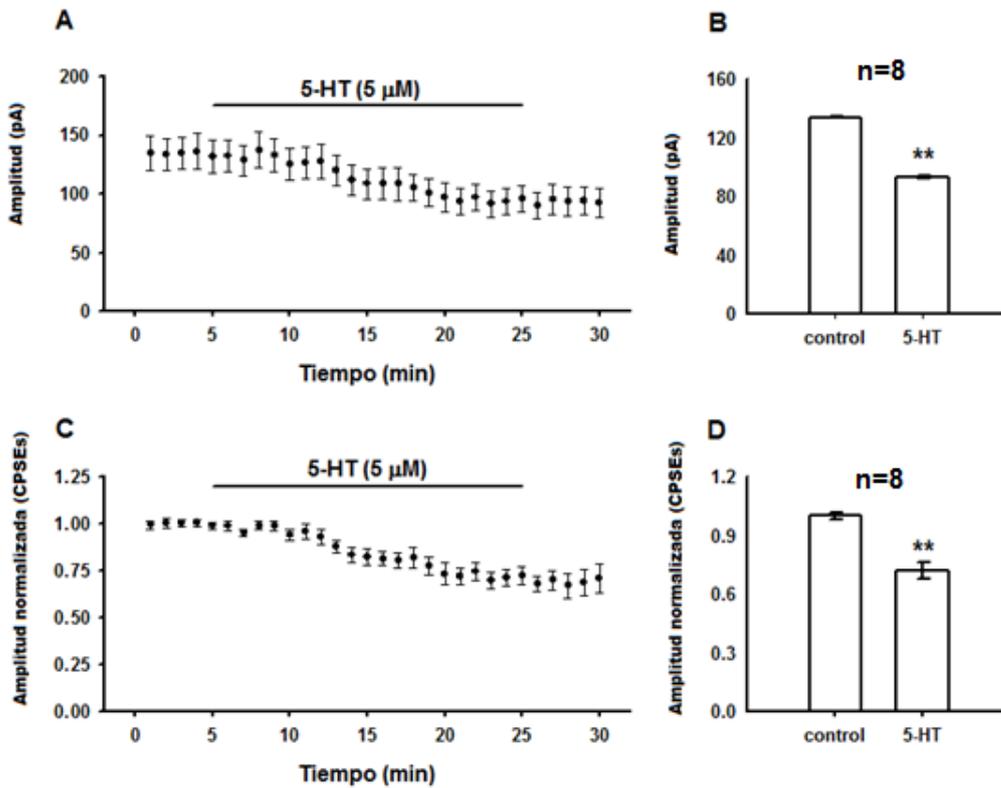


Figura 16. Efecto de la 5-HT (5 μ M) sobre las corrientes sinápticas glutamatergicas en la capa II/III de la corteza auditiva de la rata. A: Curso temporal de las amplitudes de CPSEs, se observa que la aplicación de 5 μ M de la 5-HT reduce la amplitud de las CPSEs. B: Amplitud (media \pm error estándar) en condiciones control y tras aplicar la 5-HT. C: Curso temporal de amplitudes normalizadas. D: amplitud normalizada en condiciones control y después de la aplicación de la 5-HT, el efecto de 5 μ M de la 5-HT produjo una disminución de las CPSEs ($n=8$, $p=0.008$, prueba de t pareada).

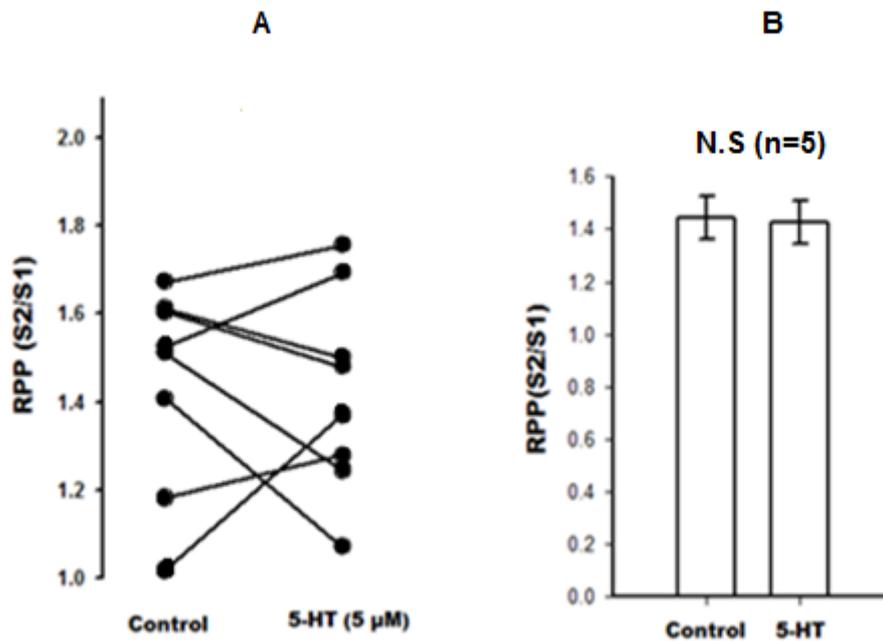


Figura 17. Efecto de la aplicación de 5 μM de la 5-HT sobre la relación de pulso pareado (RPP). A: Se muestra la RPP en células individuales antes y después de aplicar la 5-HT (5 μM) B: Se muestra el resumen de las acciones de la 5-HT sobre la RPP en 8 células registradas (media ± error estándar). Note que la aplicación de la 5-HT no cambió la RPP (p=0.883).

La aplicación de la 5-HT (10 μM) provocó una reducción del $29.11 \pm 2.77\%$, de 174.95 ± 1.12 pA en condiciones control a 119.29 ± 3.76 pA en presencia de la 5-HT (n=9, $p < 0.001$, prueba *t* pareada). La figura 18A muestra el curso temporal de las amplitudes de las CPSEs antes y durante la aplicación de la 5-HT (10 μM) (n=9, $p < 0.001$, prueba *t* pareada). La figura 18B muestra el resumen de la aplicación de la 5-HT sobre la amplitud de las CPSEs. La figura 18C muestra el curso temporal de las amplitudes normalizadas de las CPSEs antes y durante la aplicación de la 5-HT (10 μM) (n=9, $p < 0.001$, prueba *t* pareada). El resumen de la aplicación de la 5-HT sobre la amplitud de las CPSEs es mostrado en la Figura 18D. Por otro lado, la 5-HT (10 μM) no produjo cambios en la relación de pulso pareado, de 1.54 ± 0.06 en condiciones control a 1.57 ± 0.06 en presencia de la 5-HT (n=8, $p = 0.751$, prueba *t* pareada, Figura 19 A y B).

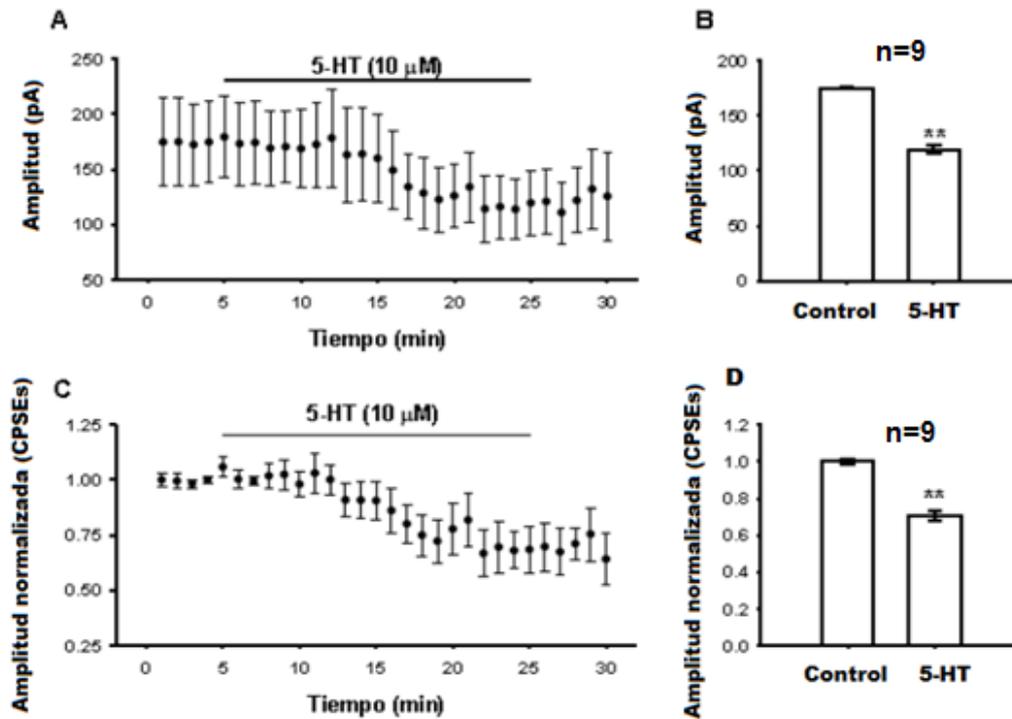


Figura 18. Efecto de la 5-HT (10 μ M) sobre las corrientes sinápticas glutamatérgicas en la capa II/III de la corteza auditiva de la rata. A: Curso temporal de las amplitudes de CPSEs, se observa que la aplicación de 10 μ M de la 5-HT reduce la amplitud de las CPSEs. B: Amplitud (media \pm error estándar) en condiciones control y tras aplicar la 5-HT. C: Curso temporal de amplitudes normalizadas. D: amplitud normalizada en condiciones control y después de la aplicación de la 5-HT, el efecto de 10 μ M de la 5-HT produjo una disminución de las CPSEs (n=9, $p < 0.001$, prueba *t* pareada).

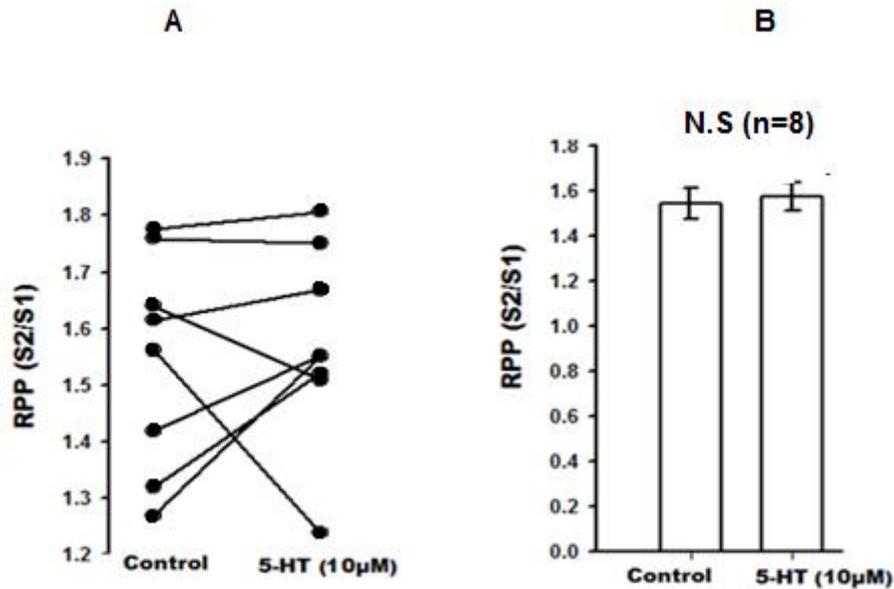


Figura 19. Efecto de la aplicación de 10 μM de la 5-HT sobre la relación de pulso pareado (RPP). A: Se muestra la RPP en células individuales antes y después de aplicar la 5-HT (10 μM) B: Se muestra el resumen de las acciones de la 5-HT sobre la RPP en 9 células registradas (media ± error estándar). Note que la aplicación de la 5-HT no cambió la RPP (n=9, p=0.751, prueba *t* pareada).

Curva concentración-efecto de la 5-HT

El resumen del efecto de la 5-HT a diferentes concentraciones sobre las corrientes sinápticas glutamatérgicas, en escala logarítmica, es mostrado en la figura 20. El ajuste mediante la ecuación de Hill proporcionó un efecto máximo de 31.90 ± 2.87 y una CE_{50} de 1.035 μM (n=5 para la concentración de 100 nM, n=6 para 500 nM y 1 μM, n=8 para 5 μM y n=8 para 10 μM). Como se puede observar en la figura 20, el efecto máximo observado se encontró a una concentración de 5 μM. Por esta razón se decidió utilizar la concentración de 5 μM la 5-HT en los experimentos posteriores.

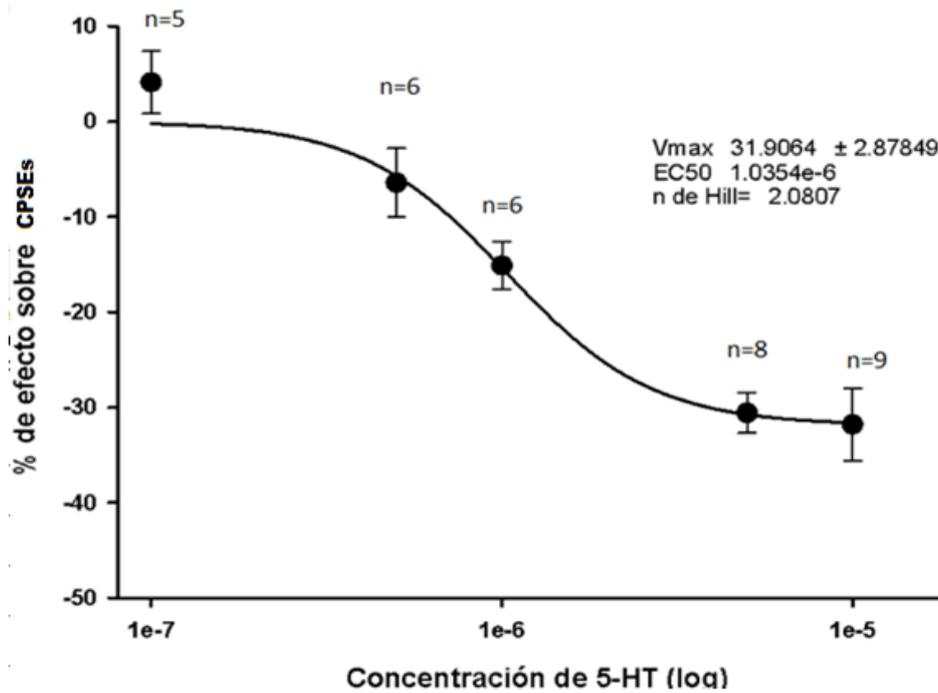


Figura 20. Curva concentración-efecto de la 5-HT sobre las corrientes sinápticas glutamatergicas en la capa II/III de la corteza auditiva de la rata. Se encontró una inhibición máxima de las CPSEs de $31.90 \pm 2.87\%$ y una CE_{50} de $1.035 \mu\text{M}$, el efecto máximo observado se encontró a una concentración de $5 \mu\text{M}$.

Los receptores 5-HT₁ y 5-HT₂ reducen las corrientes sinápticas glutamatergicas

Para identificar los receptores implicados en el efecto de la 5-HT sobre la transmisión sináptica glutamatergica en la corteza auditiva de rata, primeramente, se probó el efecto del agonista del receptor 5-HT_{2A}, DOI, sobre las CPSEs de neuronas piramidales de la capa II/III. La aplicación de DOI ($10 \mu\text{M}$), provocó una reducción de las CPSEs del $13.37 \pm 0.04\%$ (Figura 21A y B, $p = <0.001$, $n=10$, prueba t pareada). En la figura 22A y B se muestra la relación de pulso pareado (RPP) en condiciones control y al aplicar DOI en células individuales. En condiciones control la relación de la amplitud media de la segunda corriente con respecto a la primera fue de 1.41 ± 0.03 . Al aplicar DOI de la en el baño, la relación de pulso pareado fue de 1.43 ± 0.03 . Estos resultados indican que no hay cambios en el RPP después de la aplicación del DOI ($n=10$, $p= 0.623$, prueba t pareada).

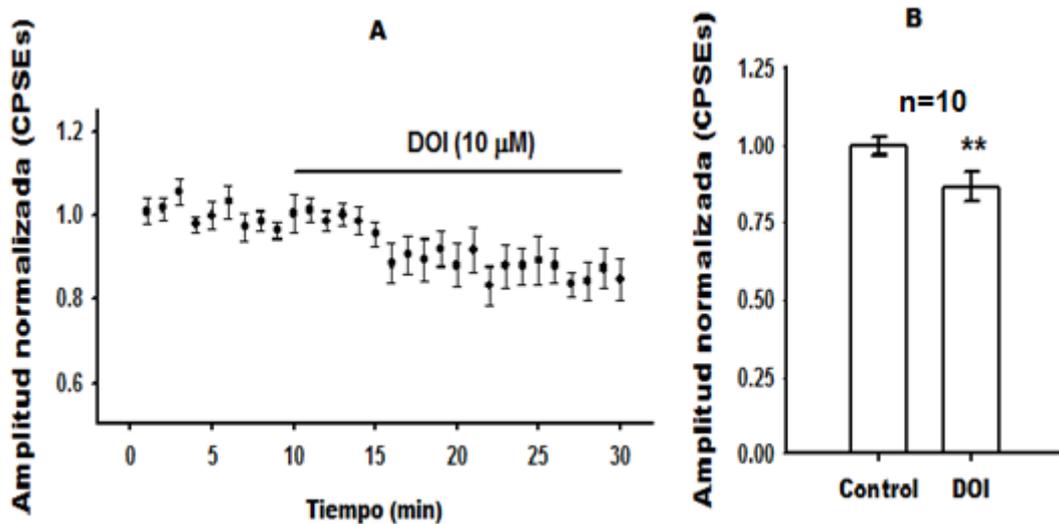


Figura 21. Efecto de DOI sobre CPSEs normalizadas. A: Curso temporal de las amplitudes normalizadas de los CPSEs, se muestra la reducción en la amplitud de las CPSEs en 10 neuronas piramidales registradas. B: Se muestra un resumen de los efectos del DOI sobre la amplitud de las CPSEs normalizadas en todas las células registradas. La disminución de la amplitud de las CPSEs ocasionada por el DOI fue estadísticamente significativa (n=10, $p < 0.001$, prueba t pareada).

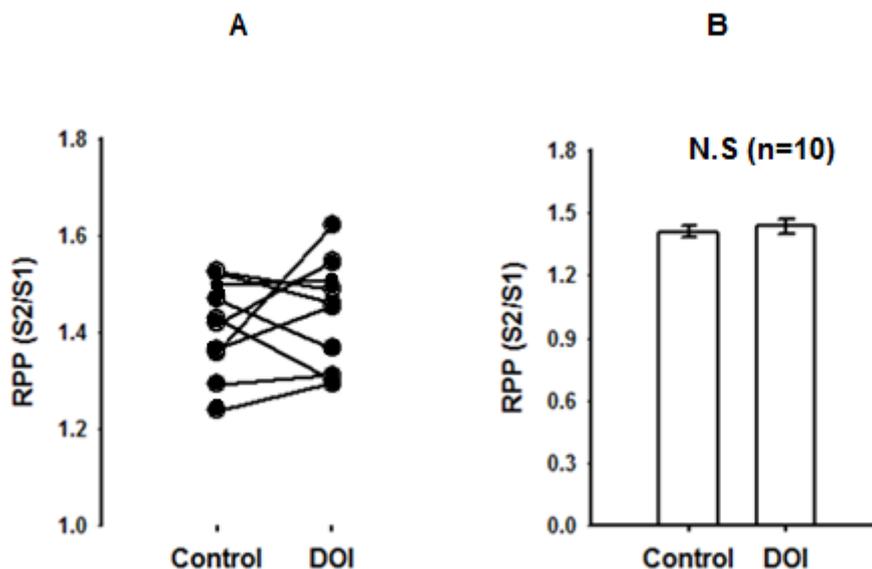


Figura 22. Efecto de la aplicación de DOI sobre la relación de pulso pareado (RPP). A: Efectos de la aplicación de DOI sobre el RPP de células individuales (n=10). B: Resumen del efecto de la aplicación de DOI sobre el RPP (media \pm error estándar). La RPP no mostró cambios estadísticamente significativos (N.S) al aplicar el agonista DOI (n=10, $p= 0.623$, prueba t pareada).

Por otro lado, la aplicación del agonista del receptor $5HT_{1A}$, el 8-OH-DPAT ($10\mu\text{M}$), provocó una disminución del $13.55 \pm 0.07\%$ (n=10, $p=0.001$, prueba t pareada). En la figura 23A se muestra el curso temporal de las CPSEs normalizadas en condiciones control y al aplicar 8-OH-DPAT. En la figura 24A se muestra la relación de pulso pareado (RPP) en condiciones control y al aplicar 8-OH-DPAT en células individuales. En condiciones control la RPP fue de 1.60 ± 0.2 y en presencia del 8-OH-DPAT fue de 1.52 ± 0.14 (n=10, $p= 0.273$, prueba t pareada).

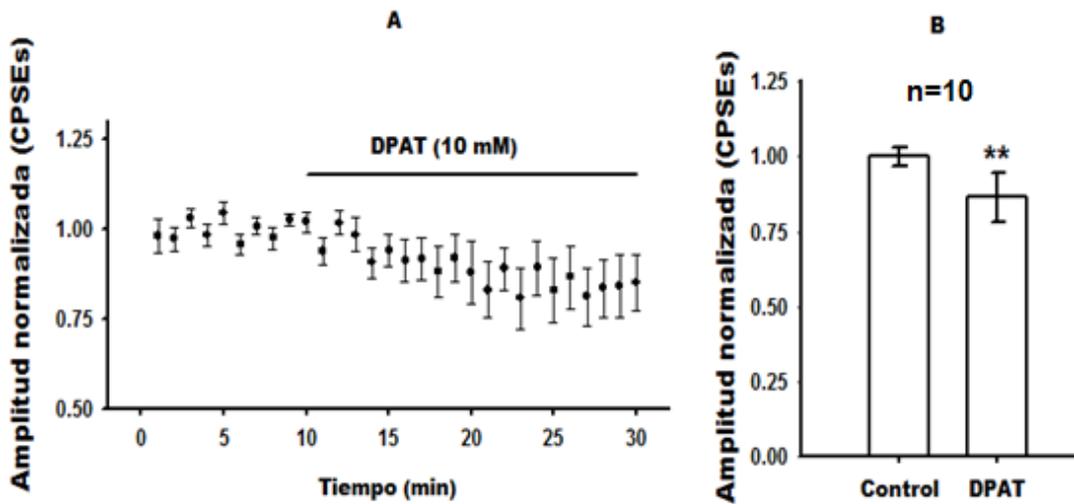


Figura 23. Efecto del agonista del receptor 5-HT_{1A} sobre las CPSEs. A: Curso temporal de las amplitudes normalizadas de los CPSEs. Se muestra la reducción en las amplitudes de las CPSEs en presencia del agonista de los receptores 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT, 10 μ M). B: Amplitud normalizada (media \pm error estándar) en condiciones control y en presencia de 8-OH-DPAT. El agonista 8-OH-DPAT tuvo un efecto estadísticamente significativo (N.S) sobre las amplitudes de las CPSEs (n=10, p=0.001, prueba *t* pareada).

Estos resultados nos sugieren que la modulación ejercida por la 5-HT sobre la transmisión sináptica glutamatérgica esta mediada principalmente por la activación de los receptores 5-HT₁ y 5-HT₂.

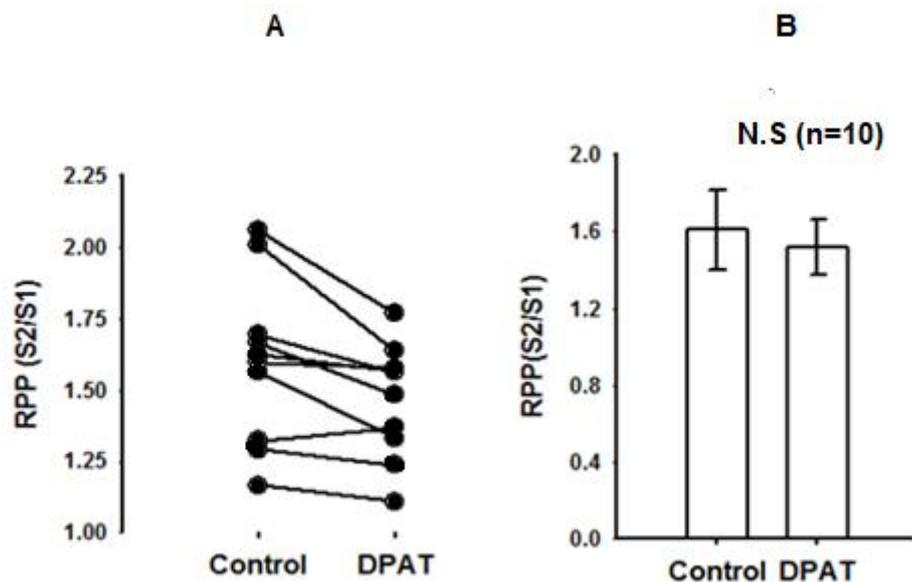


Figura 24. Efecto de la aplicación de 8-OH-DPAT sobre la relación de pulso pareado (RPP). A: Efectos de la aplicación de 8-OH-DPAT sobre el RPP de células individuales (n=10) B: Resumen del efecto de la aplicación de la 8-OH-DPAT sobre la RPP (media \pm error estándar). La RPP no mostró cambios estadísticamente significativos al aplicar el agonista 8-OH-DPAT (n=10, $p=0.273$, prueba *t* pareada).

Los antagonistas de los receptores 5-HT₁ y 5-HT₂ previenen el efecto de la 5-HT

Consistentemente con los últimos resultados, el efecto de la aplicación de la 5-HT sobre las corrientes sinápticas glutamatérgicas fue bloqueado totalmente por la previa aplicación de los antagonistas de los receptores 5-HT₁ y 5-HT₂ (NAN-190 y ritanserina, respectivamente). La reducción promedio obtenida en presencia de ambos antagonistas fue de $1 \pm 3\%$ (figura 25A y B, n=10, $p=0.537$, prueba *t* pareada).

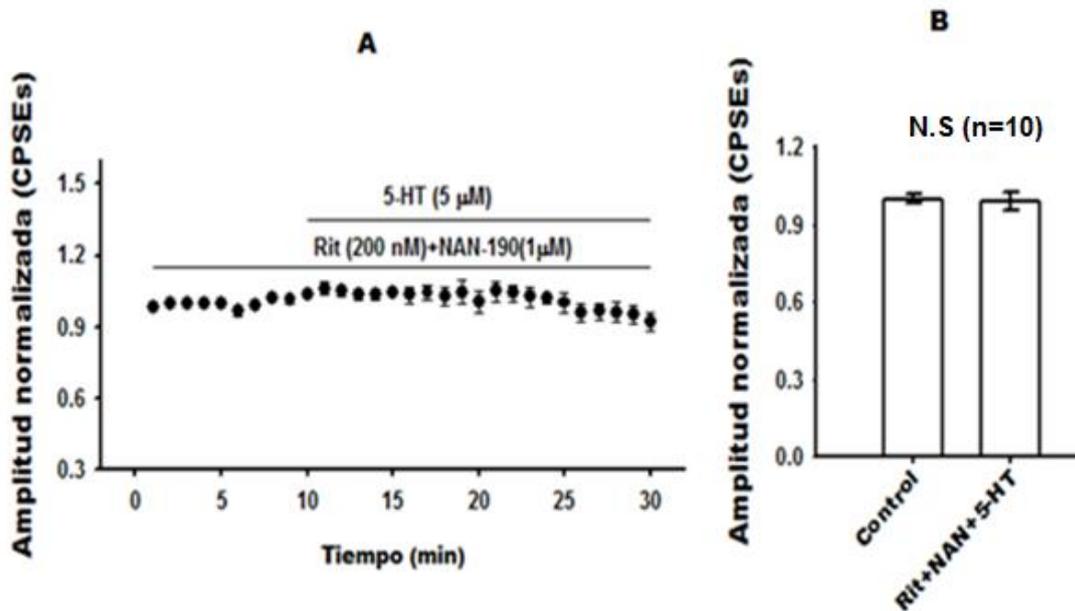


Figura 25. Efecto de los antagonistas del receptor 5HT_{1A} (NAN-190) y 5-HT_{2A} (Ritanserina), en presencia de la 5-HT (5 μ M) sobre las CPSEs. A: Curso temporal de las amplitudes normalizadas de los CPSEs. Se muestra que la 5-HT no reduce las amplitudes de las CPSEs en presencia de los antagonistas de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} (8-OH-DPAT y la ritanserina, respectivamente). B: Amplitud normalizada (media \pm error estándar), en condiciones control y en presencia de ritanserina, NAN-190 y la 5-HT (n=10, p=0.537, prueba *t* pareada).

El citalopram inhibe las CPSEs vía el receptor 5HT_{1A}

Con el fin de evaluar los efectos de la liberación endógena de 5-HT sobre las CPSEs, se utilizó el citalopram (1 μ M) para inhibir a las bombas de recaptura de la 5-HT que se encuentran en los axones serotoninérgicos de la corteza auditiva. Estudios previos en rebanadas de cerebro, han mostrado que fármacos lipofílicos como el citalopram producen su efecto lentamente⁹⁹, por lo cual en estos experimentos se aplicó citalopram por 40 minutos, para así poder observar el efecto sobre las CPSEs. En la figura 26A se muestra el curso temporal de las CPSEs normalizadas antes y después de la aplicación del citalopram. El citalopram produjo una disminución del 13 \pm 0.01% (n=6, p=0.001, prueba *t* pareada). La figura 26B muestra el resumen del efecto del citalopram. La figura 26C muestra un trazo de una CPSEs en condiciones control (en negro) y otro tras aplicar citalopram (en rojo), se puede apreciar la disminución en la amplitud de las corrientes sinápticas glutamatérgicas en presencia de citalopram. La Figura 27A muestra la RPP de células individuales en condiciones control y después del tratamiento con citalopram. En condiciones control la RPP fue de 1.35 \pm 0.03 y después de la aplicación de citalopram fue de 1.32 \pm 0.03 (n=6, p=0.114, prueba *t* pareada).

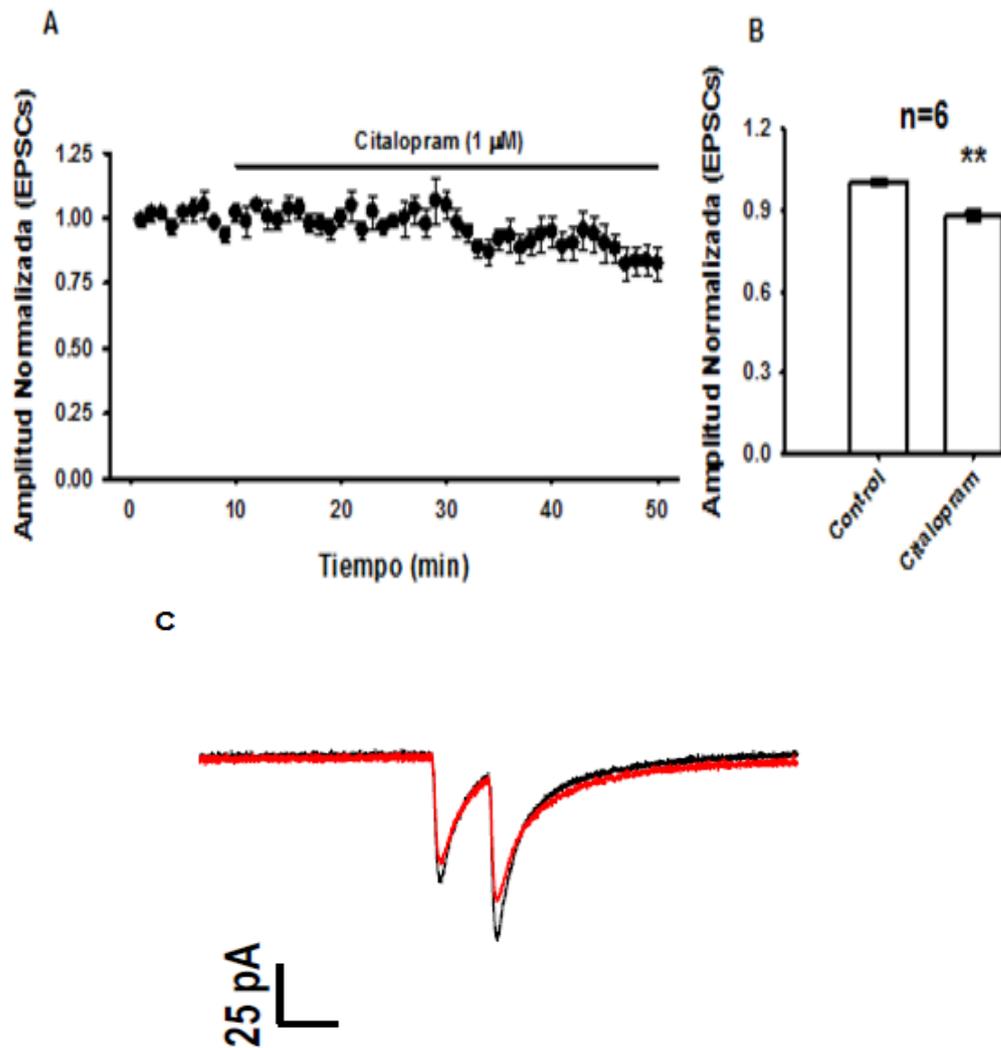


Figura 26. Efecto del citalopram sobre CPSEs. A: Curso temporal de las amplitudes normalizadas de las CPSEs. Se observa que la aplicación de citalopram (1 μ M) reduce la amplitud de las CPSEs. B: Amplitud normalizada (media \pm error estándar) de las CPSEs en condiciones control y en presencia de citalopram, el efecto inhibitorio del citalopram fue estadísticamente significativo (n=6, p=0.001, prueba *t* pareada). C: Trazos representativos de CPSEs, en color rojo se muestra la amplitud en presencia de citalopram y en negro, en condiciones control, se puede apreciar una disminución en el tamaño del trazo en presencia de citalopram.

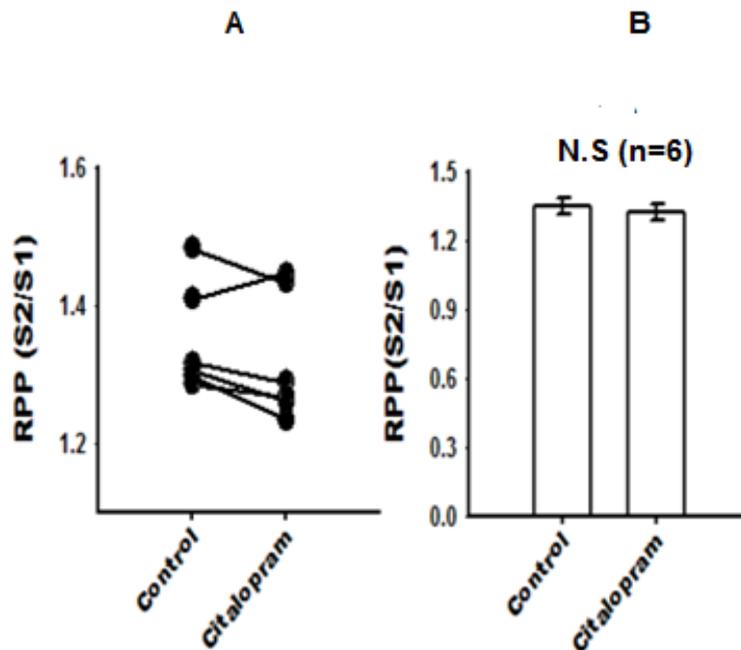


Figura 27. Efecto de la aplicación de citalopram sobre la relación de pulso pareado (RPP). A: Efectos de la aplicación de citalopram sobre el RPP de células individuales (n=6) B: Resumen del efecto de la aplicación del citalopram sobre el RPP (media± error estándar). La RPP no mostró cambios estadísticamente significativos (N.S) al aplicar el citalopram (n=6, $p=0.114$, prueba t pareada).

Citalopram y ritanserina

Para estudiar los receptores que son activados por la 5-HT endógena, se realizaron experimentos donde se bloqueó el receptor 5-HT_{2A} con el antagonista ritanserina (200nM). En la figura 28A se observa el curso temporal de las CPSEs normalizadas, la aplicación de citalopram en presencia de ritanserina, produjo una disminución en la amplitud de las CPSEs del $15.81 \pm 0.07\%$ ($p=0.001$, $n=6$, prueba t pareada). La figura 29A muestra la RPP de células individuales en condiciones control y del tratamiento. En condiciones control la RPP fue de 1.48 ± 0.10 , y en presencia del citalopram en conjunto con la ritanserina, fue de 1.44 ± 0.09 ($n=6$, $p=0.937$, prueba t pareada).

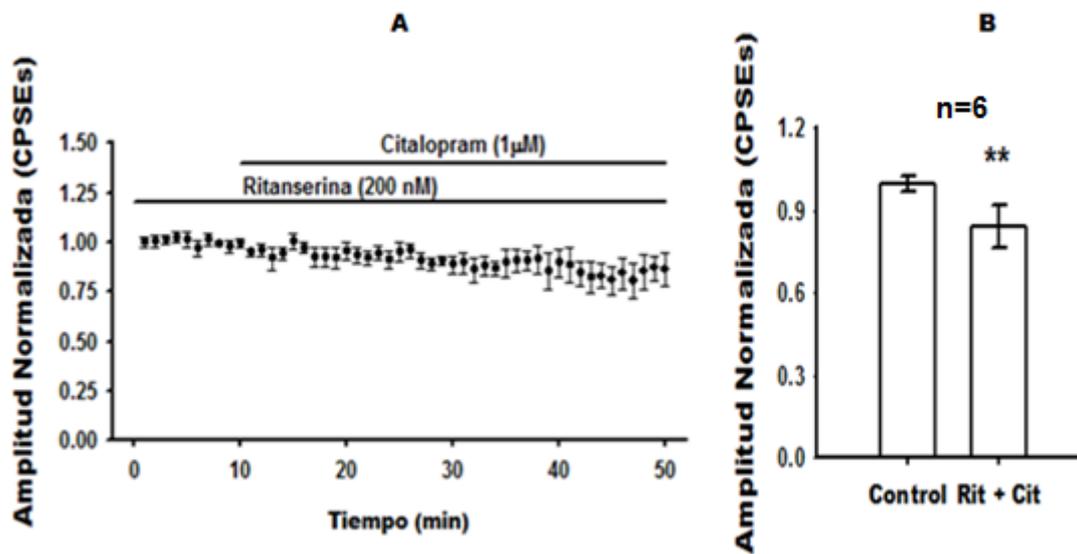


Figura 28. Efecto del citalopram en presencia de Ritanserina sobre las CPSEs. A: Curso temporal de las amplitudes normalizadas de las CPSEs, B: Amplitud normalizada (media \pm error estándar), en condiciones control y en presencia de ritanserina y citalopram donde se aprecia una disminución estadísticamente significativa de las CPSEs ($p=0.001$, $n=6$, prueba t pareada).

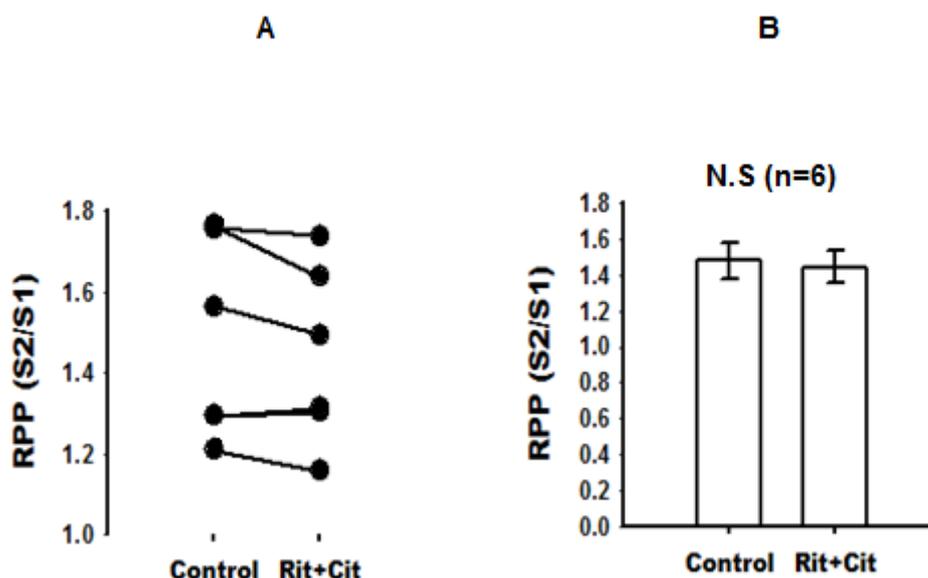


Figura 29. Efecto de la aplicación del citalopram y ritanserin sobre la relación de pulso pareado (RPP). A: Efectos de la aplicación de citalopram y ritanserin sobre el RPP de células individuales (n=6) B: Resumen del efecto de la aplicación del citalopram y ritanserin (media \pm error estándar), la RPP no mostró cambios estadísticamente significativos (n=6, $p=0.937$, prueba t pareada).

Citalopram y NAN-190

Posteriormente, se realizaron experimentos donde se bloqueó al receptor $5HT_{1A}$ con el antagonista NAN-190(1 μ M). En la figura 30A se observa el curso temporal de las CPSEs normalizadas, la aplicación de citalopram en presencia de NAN-190 no produjo la disminución de las CPSEs. (n=6, $p=0.288$, prueba t pareada). La figura 31A muestra la RPP de células individuales en condiciones control y tratamiento. En condiciones control la RPP fue de 1.26 ± 0.07 y después de aplicar citalopram en presencia de NAN-190, la RPP fue de 1.27 ± 0.05 (n=6, $p=0.424$, prueba t pareada).

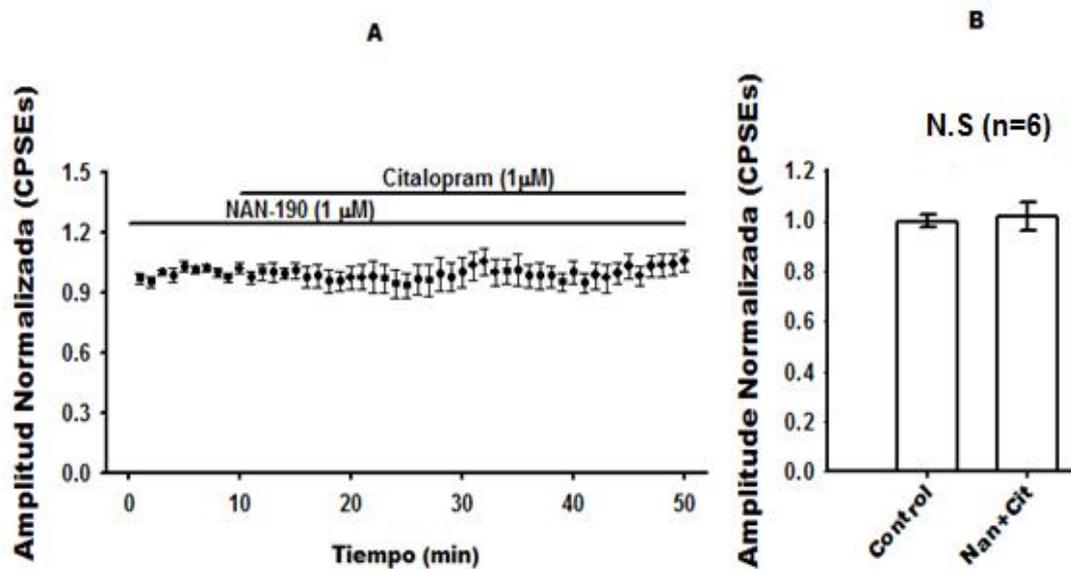


Figura 30. Efecto del citalopram en presencia de NAN-190 sobre las CPSEs. A: Curso temporal de las amplitudes normalizadas de los CPSEs, se muestra que la previa aplicación del antagonista de los receptores 5-HT_{1A} (NAN-190) bloquea el efecto de la aplicación de citalopram sobre la amplitud de las CPSEs. B: Amplitud normalizada (media \pm error estándar), en condiciones control y en presencia de NAN-190 y citalopram. El citalopram no tiene efecto estadísticamente significativo cuando el NAN-190 está presente en el baño (n=6, $p = 0.288$, prueba t pareada).

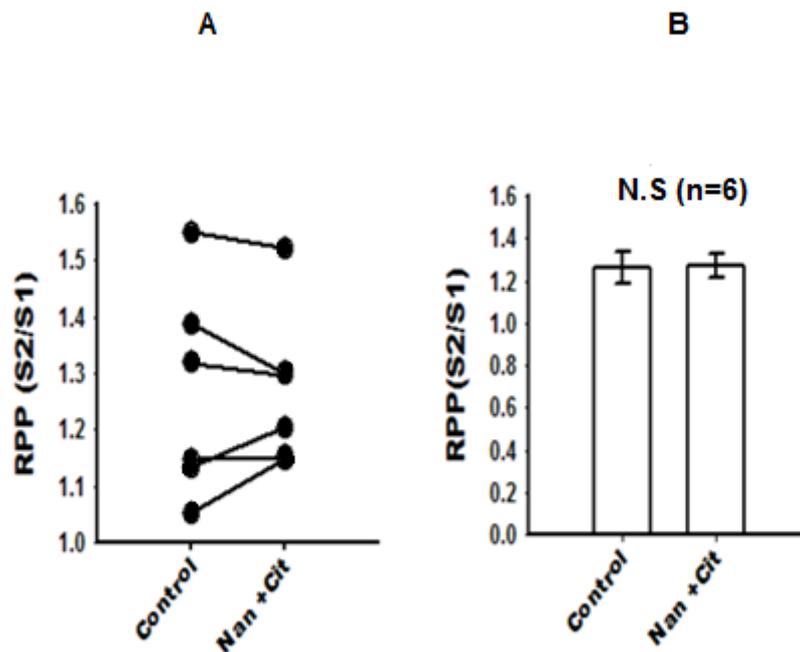


Figura 31. Efecto de la aplicación del citalopram y NAN-190 sobre la relación de pulso pareado (RPP). A: Efectos de la aplicación de citalopram y NAN-190 sobre el RPP de células individuales (n=6) B: Resumen del efecto de la aplicación del citalopram y NAN-190 sobre el RPP (media \pm error estándar). La RPP no mostró cambios estadísticamente significativos (N.S), (n=6, $p=0.424$, prueba t pareada).

La figura 32 presenta un resumen de los grupos experimentales, aplicando un análisis de varianza de una vía y posteriormente la prueba post hoc de Bonferroni, se encontró diferencia estadísticamente significativa en los siguientes grupos: Control vs citalopram ($p= <0.001$), control vs citalopram y ritanserina ($p=<0.001$), citalopram vs citalopram y NAN-190 ($p=<0.001$), citalopram y ritanserina vs citalopram y NAN-190 ($p=<0.001$). Por otro lado, no se encontró diferencia estadística en el grupo citalopram y NAN-190 vs control, No se encontró diferencia estadística entre los grupos citalopram y ritanserina vs citalopram ($p=0.201$).

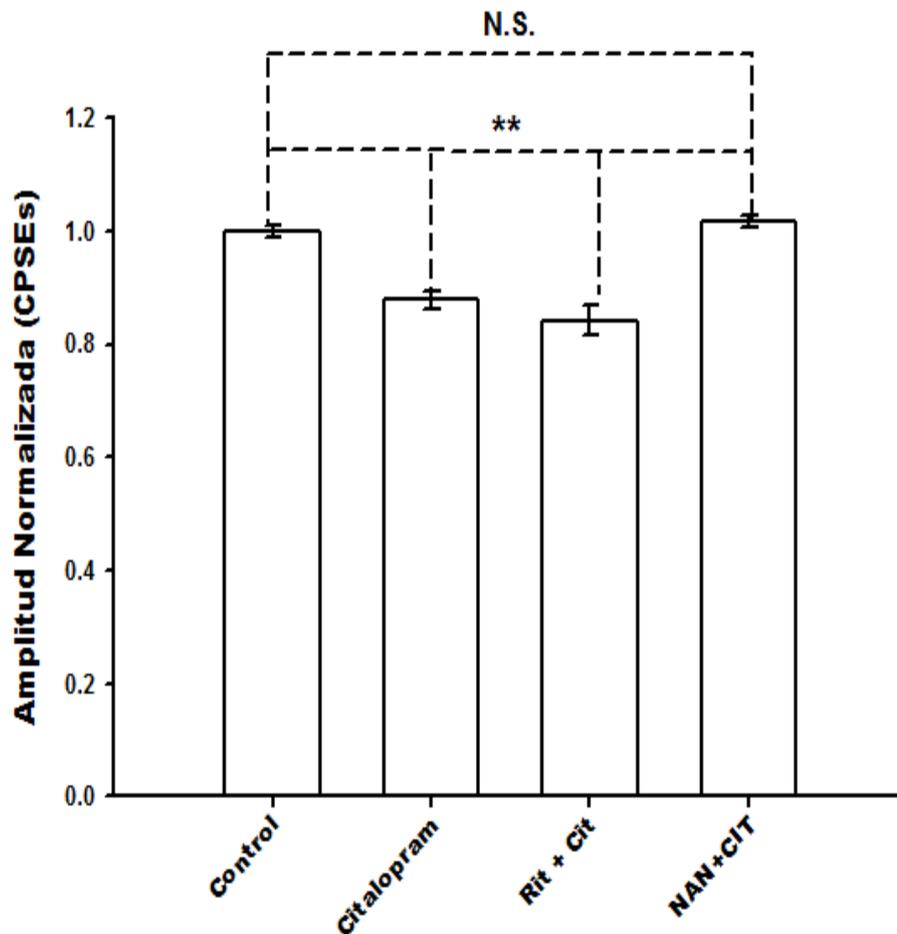


Figura 32. El citalopram reduce la transmisión sináptica glutamatérgica vía activación de los receptores 5-HT_{1A}. Se muestra que solo la aplicación del antagonista de los receptores 5-HT_{1A} ocluyó el efecto del citalopram sobre las CPSEs en la capa II/III de la corteza auditiva.

En conjunto los resultados sugieren que la administración del citalopram incrementa la concentración extracelular de la 5-HT a una concentración de 1 μ M, concentración que activa únicamente a los receptores 5-HT₁. En cambio, la administración exógena de la 5-HT activa a los receptores 5-HT₁ y 5-HT₂ para inhibir la transmisión sináptica glutamatérgica en las capas II/III en la corteza auditiva de ratas juveniles. En la figura 33 se representa el mecanismo de acción de la 5-HT sobre la sinapsis glutamatérgica y los receptores implicados, las vías de señalización activadas por los receptores 5-HT_{1A} y 5HT_{2A} para modular las CPSEs, no fueron estudiadas en este trabajo.

Discusión

En este trabajo, se muestra por primera vez, mediante registros electrofisiológicos, la modulación de la serotonina (5-HT) endógena y exógena para controlar la transmisión sináptica glutamatérgica en las capas II/III de la corteza auditiva de ratas juveniles (días posnatales 25-30). Nuestros resultados indican diferencias entre la modulación de las corrientes sinápticas excitadoras (CPSEs) por la 5-HT exógena y endógena.

Se encontró que la aplicación exógena de la 5-HT reduce significativamente las CPSEs en las capas II/III de la corteza auditiva de la rata, y este efecto es dependiente de la concentración. La curva concentración-respuesta de la 5-HT dio como resultado una EC_{50} de $1.033 \mu\text{M}$, y una inhibición máxima del $31.90 \pm 2.87\%$ de las amplitudes de las CPSEs. Estos resultados son similares a lo reportado por Torres Ramírez y cols. (2015), quienes muestran que la 5-HT produce una disminución de la transmisión sináptica GABAérgica con una EC_{50} de $1.1 \mu\text{M}$ en las capas II/III de la corteza auditiva de la rata¹⁴. Por el contrario, en la corteza entorrinal la 5-HT incrementa la frecuencia de las corrientes sinápticas inhibitoras registradas en células piramidales con una EC_{50} de $2.4 \mu\text{M}^{100}$. Asimismo, en la corteza entorrinal la serotonina inhibe la frecuencia de disparo de las células piramidales de la capa II/III con una EC_{50} de $0.48 \mu\text{M}$, con un efecto máximo producido a una concentración de $2 \mu\text{M}$, este efecto fue bloqueado por el antagonista de los receptores 5-HT_{1A}⁷⁸. Las diferencias en las EC_{50} de la 5-HT en las diferentes regiones cerebrales pueden deberse a que la 5-HT activa a diferentes receptores. Estos datos farmacológicos sugieren que los receptores que tienen una mayor afinidad por la 5-HT, son los receptores 5-HT_{1A} ($0.48 \mu\text{M}$) y los que tienen una menor afinidad son los 5-HT_{2A} ($2.4 \mu\text{M}$). Probablemente por esta razón, en la corteza auditiva, la EC_{50} que se obtuvo de la 5-HT para inhibir las corrientes sinápticas fue intermedia ($1.033 \mu\text{M}$, si lo comparamos con los resultados obtenidos en la corteza entorrinal).

Los resultados del presente estudio indican que la modulación serotoninérgica ejercida por la aplicación de la 5-HT exógena fue mediada por la activación de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A}, en cambio, con la aplicación del citalopram y el subsecuente incremento en la concentración extracelular de la 5-HT endógena,

la modulación ejercida fue llevada a cabo por la activación de los receptores 5-HT_{1A}. Esto puede deberse a que la concentración de la 5-HT a nivel extracelular causada por el citalopram fue muy baja. Por esta razón, se extrapoló el efecto inhibitorio causado por el citalopram sobre la amplitud de las CPSEs en la curva concentración-respuesta generada por la aplicación de la 5-HT exógena. Este análisis arrojó una concentración de la 5-HT a nivel extracelular de 977 nM (en presencia de citalopram), dicha concentración solo permitiría que se activaran los receptores 5-HT_{1A} y no los 5-HT_{2A}.^{78,100} Además, la baja concentración extracelular de la 5-HT inducida por la inhibición de la recaptura de la 5-HT por el citalopram, puede ser explicada por que los receptores 5-HT_{1A} también se encuentran en la fibra serotoninérgica como autorreceptores, los cuales inhiben la liberación de la 5-HT⁶⁷, a través de la inhibición de la entrada de Ca²⁺ por los canales N y P/Q en la terminal sináptica^{101,102}. Sin embargo, en nuestro estudio no se probó la posible participación de los receptores 5-HT_{1A} como autorreceptores, ya que hasta la fecha no se cuenta con antagonistas específicos que diferencien al receptor 5-HT_{1A} presináptico del hetero-receptor 5-HT_{1A} postsináptico. Aún más, en un artículo de meta-análisis, se reporta que la concentración extracelular de la 5-HT causada por el uso de inhibidores específicos de su recaptura, incrementan ligeramente la concentración extracelular de la 5-HT en diferentes áreas cerebrales, incluyendo a la corteza prefrontal. Esto ocurrió durante los primeros 15 días de administración. Notablemente, la concentración de la 5-HT endógena incrementó en más del 200% después de tres semanas de tratamiento¹⁰³. Los autores refieren que este efecto tardío se da por la desensibilización de los autorreceptores 5-HT_{1A} localizados en la fibra serotoninérgica.

Por otro lado, los resultados sugieren que en la capa II/III de la corteza auditiva, la función que ejercen los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A}, es la de inhibir la transmisión sináptica glutamatérgica vía la modulación postsináptica de los receptores AMPA. Las evidencias que apoyan estas observaciones son las siguientes: (1) La administración de la serotonina exógena causó una inhibición de las corrientes sinápticas glutamatérgicas sin cambiar la relación de pulso pareado. (2) El agonista de los receptores 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT, 10 mM) y de

los receptores 5-HT_{2A} (DOI, 10mM) causaron una reducción en la amplitud de las CPSEs sin cambiar la relación de pulso pareado, sugiriendo con ello, que ambos tipos de receptores inhiben la transmisión sináptica glutamatergica a nivel postsináptico por inhibir la función de los receptores AMPA. (3) Este efecto fue bloqueado por la administración previa de los antagonistas de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A}, NAN-190 y ritaserina, respectivamente. (4) El incremento de la serotonina endógena por la administración del citalopram causó una reducción en la amplitud de las CPSEs sin cambiar la relación de pulso pareado. Este efecto fue mediado por los receptores 5-HT_{1A}, ya que la administración previa del antagonista de estos receptores (NAN-190) ocluyó totalmente la reducción en la amplitud de las CPSEs observadas por la aplicación del citalopram. En la figura 33, se muestra un esquema resumiendo las acciones de la 5-HT exógena y endógena sobre la transmisión sináptica glutamatergica en la capa II/III de la corteza auditiva de ratas juveniles.

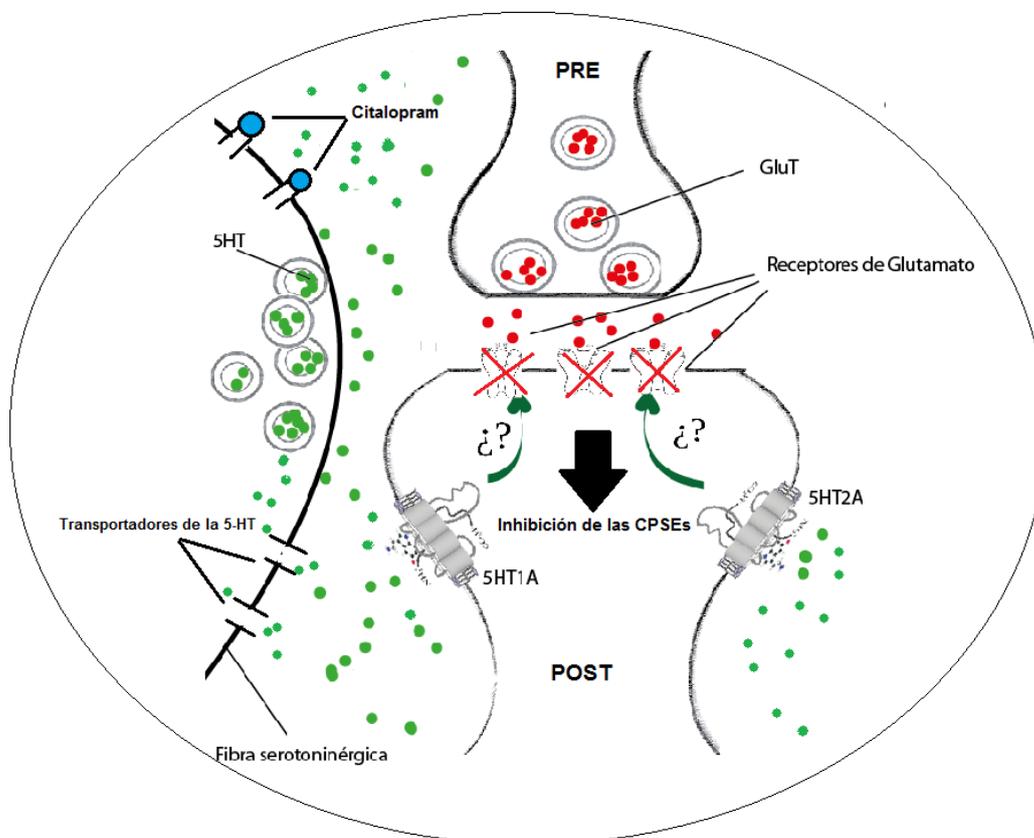


Figura 33. Representación del mecanismo de acción de la 5-HT en la corteza auditiva. Se observa una fibra serotoninérgica, proveniente de los núcleos de Rafe, liberando la 5-HT sobre una sinapsis glutamatérgica de la corteza auditiva. La aplicación exógena de la 5-HT, produjo una inhibición de las CPSEs activando a los receptores 5HT_{1A} y 5HT_{2A} de la terminal postsináptica (POST); por el contrario, la concentración endógena de la 5-HT por bloquear los transportadores de la 5-HT mediante la aplicación del citalopram, solo fue capaz de activar al receptor 5HT_{1A} para producir la inhibición. Las vías de señalización activadas por estos receptores para modular a los receptores glutamato, no fueron estudiadas en este trabajo.

Hasta donde sabemos, no existen trabajos sobre los efectos de la activación de los receptores 5-HT_{1A} sobre la transmisión sináptica glutamatérgica de la corteza auditiva causadas por la administración del citalopram, por lo que el presente estudio es el primero en abordar los efectos moduladores del citalopram y del receptor 5-HT_{1A} sobre la transmisión sináptica glutamatérgica. En contraste, Basura y cols. en el 2008, reportaron la expresión de los receptores 5-HT_{2A} sobre las neuronas piramidales de la corteza auditiva⁷⁴. Sin embargo, tampoco existen reportes para esta área cortical que muestren la modulación de la transmisión sináptica glutamatérgica mediada por los receptores 5-HT_{2A}, por lo que el presente estudio es el primero en abordar el papel del receptor 5-HT_{2A} en la modulación de la transmisión sináptica glutamatérgica de la corteza auditiva. Esto concuerda con resultados obtenidos por medio de estudios de inmuno-histoquímica en donde se reporta que los receptores 5-HT_{2A} se encuentran expresados en la capa II/III de la corteza auditiva⁷⁴.

Resultados similares al presente estudio han sido encontrados en otras áreas cerebrales. Por ejemplo, en la corteza prefrontal, la activación de los receptores 5-HT_{1A} inhibe corrientes glutamatérgicas de tipo AMPA en neuronas disociadas y CPSEs en miniatura (en rebanadas), a través de la activación de la proteína fosfatasa 1 (PP1) que promueve la de-fosforilación de la proteína calcio calmodulina quinasa II (CaMKII), resultando en que el receptor AMPA no se fosforile por la proteína cinasa A (PKA) reduciendo su probabilidad de apertura⁷⁷. Además, en la vía perforante medial del hipocampo, la activación de

los receptores 5-HT_{1A} reducen la amplitud de los potenciales sinápticos excitadores¹⁰⁴, además de inhibir corrientes de NMDA en neuronas de la corteza prefrontal¹⁰⁵. También, en neuronas sensoriales del tálamo, la activación de los receptores 5-HT_{1A} reduce la amplitud de las CPSEs¹⁰⁶. Además, la aplicación del agonista de los receptores 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT) redujo la amplitud y la frecuencia de las corrientes sinápticas glutamatérgicas en la sinapsis entre las fibras paralelas y las fibras de Purkinje del cerebelo, sugiriendo que la activación de los receptores 5-HT_{1A} disminuye la liberación de glutamato en esta área¹⁰⁷.

Por otro lado, para los receptores 5-HT_{2A}, un estudio reciente indica que su activación reduce los potenciales postsinápticos excitadores de la vía perforada lateral del hipocampo hacia el giro dentado¹⁰⁴. Además, de que la activación de los receptores 5-HT_{2A} reduce la frecuencia y la amplitud de las corrientes sinápticas glutamatérgicas en miniatura en las sinapsis entre las fibras paralelas y las células de Purkinje del cerebelo, sugiriendo que los efectos del receptor 5-HT_{2A} pueden ocurrir tanto a nivel pre y post-sináptico¹⁰⁷. En contraste, la aplicación del agonista de los receptores 5-HT_{2A} (DOI), en rebanadas corticales cultivadas produce el incremento en la frecuencia y amplitud de las corrientes sinápticas en miniatura, sugiriendo una modulación presináptica¹⁰⁸. Además, el receptor 5-HT_{2A} ha mostrado tener un papel mayormente excitador en la corteza prefrontal¹⁰⁹, y en la corteza piriforme, donde el receptor 5-HT_{2A} activa interneuronas que se encuentran en los bordes de las capas II/III, incrementando la amplitud de los potenciales inhibitorios postsinápticos¹¹⁰. Por el contrario, algunos estudios utilizando la técnica de *Patch clamp* en cultivos de neuronas corticales, muestran que la aplicación de DOI (Agonista de los receptores 5-HT_{2A}), reduce la frecuencia de disparo de potenciales de acción.^{108, 111}

En otro orden de ideas, la activación de ambos receptores serotoninérgicos (5-HT_{1A} y 5-HT_{2A}), promueven la activación de diferentes vías de señalización intracelular para modular la excitabilidad neuronal en la corteza cerebral. El receptor 5-HT_{1A} se acopla a una proteína G_{i/o}, que produce la inhibición de la enzima adenilato ciclasa y la reducción de la formación de AMP cíclico¹¹² o activando a canales rectificadores de K⁺, lo cual resulta en la hiperpolarización

de la membrana de las neuronas^{113, 114,115} También se ha propuesto que los receptores 5-HT_{1A} disminuyen la entrada de Ca²⁺ en la presinapsis vía la interacción del complejo βγ de la proteína G con los canales de Ca²⁺¹¹⁶. En cambio, la activación de los receptores 5-HT_{2A} y que se encuentran acoplados a una proteína Gq activan un mecanismo que implica la estimulación de PLCβ, la hidrólisis de fosfolípidos y la activación del complejo PKC¹¹⁷. De acuerdo con esta observación, la fosforilación de los receptores ionótrópicos por la PKC causa una reducción o incremento en la amplitud de las corrientes sinápticas y la reducción del disparo neuronal^{117,118,119,120} Es importante mencionar que el efecto observado por el receptor 5-HT_{2A} sobre las CPSEs en este estudio, puede que sea resultado de la activación de una vía de señalización intracelular diferente, sin embargo, hacen falta estudios para identificar el mecanismo de acción del receptor 5-HT_{2A} en la corteza auditiva de rata.

Notablemente, todas estas acciones de la 5-HT en la corteza cerebral concuerdan con la expresión de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} en las diferentes áreas corticales, tanto en neuronas piramidales como en interneuronas¹²¹.

Este patrón modulador de los receptores de la 5-HT ha sido observado en otras áreas corticales, sugiriendo que la 5-HT juega un doble papel en la corteza, promoviendo las entradas sinápticas en las dendritas de las células excitadoras (5-HT_{2A}) y evitando el disparo de los potenciales de acción (5-HT_{1A})¹²². Sin embargo, como lo muestran los resultados del presente trabajo y otros resultados en la corteza auditiva¹², en esta corteza sensorial la 5-HT solo tendría un papel inhibitor, eliminar las entradas sinápticas e inhibir la excitabilidad neuronal por inhibir la frecuencia de disparos de potenciales de acción. Curiosamente, esto último se relaciona con las ideas propuestas en varios estudios, en donde se muestra que la 5-HT tiene principalmente efectos inhibidores en las cortezas sensoriales, regulando negativamente la integración de la información de los campos receptivos sensoriales^{85,106,123,124,125,126,127,128}. Además, Ingelstrom y Heyward (2012) encontraron que el citalopram, la flouxetina y la sertralina, reducen la excitabilidad de neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo⁸⁶. En este sentido, se ha reportado que la

administración de citalopram en personas sanas reduce la amplitud de los componentes N1 y P2 de los potenciales evocados auditivos de personas sanas.¹³⁰ De igual manera, un estudio mostró que el incremento de la serotonina extracelular en la corteza auditiva, causada por la administración de citalopram, disminuye la amplitud de los potenciales evocados auditivos¹¹. Estos potenciales evocados reflejan la actividad de neuronas piramidales corticales del área primaria auditiva.^{91, 92,93} y, sugieren que el incremento de la 5-HT endógena causa una inhibición de los circuitos corticales auditivos.

En resumen, los resultados de este estudio indican que la aplicación de la 5-HT exógena activa a los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} para inhibir la transmisión sináptica glutamatérgica a nivel postsináptico. En cambio, la inhibición del transportador que permite la recaptura de la 5-HT, ocasionó un incremento en la concentración de la 5-HT extracelular (823 nM), la cual activó únicamente a los receptores 5-HT_{1A}, quienes en turno, promueven la inhibición de la transmisión sináptica glutamatérgica. Estos resultados nos permiten entender un poco más la función fisiológica de la 5-HT en la corteza auditiva, en donde, este neurotransmisor promueve una reducción en la actividad de los circuitos neuronales impidiendo que ocurra una hiper-excitación. Al mismo tiempo, nos brindan una explicación de los resultados obtenidos con las técnicas electrofisiológicas para el registro de potenciales evocados auditivos en personas deprimidas, en donde, la aplicación de fármacos como el citalopram (de uso clínico), reducen la amplitud de estos potenciales^(10,11). Más allá de esto, podemos inferir que el efecto agudo observado por la administración del citalopram sobre los potenciales evocados en personas deprimidas, se da por la activación de los receptores 5-HT_{1A}, los cuales a través de la activación de vías de señalización intracelular, reducen la actividad de esta área cortical.

Finalmente, un punto importante que se ha señalado en la literatura, es que la administración de los fármacos antidepresivos como el citalopram, no producen mejorías inmediatas en el manejo de las emociones de los pacientes, sino que se requiere de su administración prolongada (más de 3 semanas) para obtener resultados¹³⁰. Esto nos sugiere, que los efectos de los fármacos antidepresivos como el citalopram ocasionan cambios duraderos y a largo plazo en los circuitos neuronales cerebrales (plasticidad cerebral). Por lo anterior, y a

manera de propuesta para investigaciones futuras, se sugiere investigar los cambios plásticos inducidos por la aplicación crónica del citalopram (más de 3 semanas), con la finalidad de observar la adaptación dinámica del sistema serotoninérgico y sus acciones modulatorias sobre la plasticidad sináptica cerebral.

La relevancia funcional del sistema serotoninérgico sugiere que una mejor comprensión de la función de este sistema, no solo proporcionará una visión más clara del funcionamiento general de la corteza auditiva y el cerebro en general, sino que también conducirá a obtener resultados más eficaces de las enfermedades como la depresión mayor.

Conclusiones

En este estudio se evaluaron los efectos in vitro de la 5-HT exógena y endógena sobre la transmisión sináptica glutamatérgica en las capas II/III de la corteza auditiva. Nuestros resultados indican que la 5-HT exógena reduce la amplitud de las corrientes sinápticas glutamatérgicas por la activación de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} en la capa II/III de la corteza auditiva de ratas juveniles con una edad posnatal entre 25 a 30 días.

El efecto de la 5-HT exógena sobre las corrientes sinápticas glutamatérgicas mostró una dependencia de la concentración de la 5-HT. El efecto máximo de la 5-HT se dio a una concentración de 5 μM y la concentración efectiva media fue de 1.03 μM.

El efecto de la 5-HT ocurrió a nivel de la célula postsináptica, ya que la aplicación de la 5-HT y los agonistas de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} (8-OH-DPAT y el DOI, respectivamente) no cambiaron la relación de pulso pareado de las corrientes sinápticas glutamatérgicas.

El bloqueo del transportador de la recaptura de la 5-HT causó un incremento en la concentración endógena de la 5-HT, lo que inhibió la amplitud de las corrientes sinápticas glutamatérgicas a través de la activación de los receptores 5-HT_{1A}.

El efecto de la 5-HT endógena ocurrió a nivel de la célula postsináptica, ya que la aplicación del citalopram incrementó la concentración extracelular de la 5-HT, la cual disminuyó la amplitud de las corrientes sinápticas glutamatérgicas sin cambiar la relación de pulso pareado.

La 5-HT exógena y la 5-HT endógena causaron una reducción en la amplitud de las corrientes sinápticas glutamatérgicas. Sin embargo, la disminución causada por la 5-HT endógena fue de menor magnitud (13%). Esto se debió a que el citalopram inhibió la recaptura de la 5-HT, incrementando su concentración extracelular hasta los 823 nM.

Bibliografía

1. Jacobs B.L y Azmitia E.C. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiological reviews*. 1992 1; 72 (1):165-229.
2. Homberg JR, Schubert D, Asan E, Aron EN. Sensory processing sensitivity and serotonin gene variance: Insights into mechanisms shaping

- environmental sensitivity. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2016 31; 71:472-83.
3. Morin LP, Blanchard J. Depletion of brain serotonin by 5, 7-DHT modifies hamster circadian rhythm response to light. *Brain research*. 1991 6; 566(1):173-85.
 4. Meyer-Bernstein EL, Morin LP. Destruction of serotonergic neurons in the median raphe nucleus blocks circadian rhythm phase shifts to triazolam but not to novel wheel access. *Journal of biological rhythms*. 1998; 13(6):494-505.
 5. Rosen RC, Lane RM, Menza M. Effects of SSRIs on sexual function: a critical review. *Journal of clinical psychopharmacology*. 1999 1; 19 (1):67-85.
 6. Delgado, P. L., Charney, D. S., Price, L. H., Aghajanian, G. K., Landis, H., y Heninger, G. R. Serotonin function and the mechanism of antidepressant action: reversal of antidepressant-induced remission by rapid depletion of plasma tryptophan. *Archives of general psychiatry*, 1990. 47(5), 411-418.
 7. Mann, J. J. Role of the serotonergic system in the pathogenesis of major depression and suicidal behavior. *Neuropsychopharmacology*, 1999. 21, 99S-105S.
 8. Marsden, C. A., King, M. V., y Fone, K. C. Influence of social isolation in the rat on serotonergic function and memory—relevance to models of schizophrenia and the role of 5-HT 6 receptors. *Neuropharmacology*, 2011 61(3). 400-407.
 9. Lin, S. H., Lee, L. T., y Yang, Y. K. Serotonin and mental disorders: a concise review on molecular neuroimaging evidence. *Clin Psychopharmacol Neurosci*, 2014 12, 196-202.

10. Park, Y. M. Relationship between serotonergic dysfunction based on loudness dependence of auditory-evoked potentials and suicide in patients with major depressive disorder. *Psychiatry investigation*, 2015 12(4), 421-424.
11. Wutzler, A., Winter, C., Kitzrow, W., Uhl, I., Wolf, R. J., Heinz, A., y Juckel, G. Loudness dependence of auditory evoked potentials as indicator of central serotonergic neurotransmission: simultaneous electrophysiological recordings and in vivo microdialysis in the rat primary auditory cortex. *Neuropsychopharmacology*, 2008 33(13), 3176-3181.
12. Rao, D., Basura, G. J., Roche, J., Daniels, S., Mancilla, J. G. y Manis, P. B.). Hearing loss alters serotonergic modulation of intrinsic excitability in auditory cortex. *Journal of neurophysiology*, 2010. 104(5), 2693-2703.
13. García-Oscos, F., Torres-Ramírez, O., Dinh, L., Galindo-Charles, L., Pérez Padilla, E. A., Pineda, J. C. y Salgado, H. Activation of 5-HT receptors inhibits GABAergic transmission by pre-and post-synaptic mechanisms in layer II/III of the juvenile rat auditory cortex. *Synapse*, 2015 69(3). 115-127.
14. Torres-Ramírez O. Modulación de la transmisión sináptica GABAérgica por la serotonina en tres etapas del desarrollo posnatal (infancia, adolescencia y juvenil) de la corteza auditiva de la rata. 2015 Tesis. Universidad autónoma de Yucatán.
15. Valverde F Estructura de la corteza cerebral. Organización intrínseca y análisis comparativo del neocórtex. *Revista de Neurología* 2002. 34 (8): 758-780.

16. Sansom SN y Livesey FJ. Gradients in the Brain: The control of the development of form and function in the cerebral cortex. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009. 1(2)
17. Druga R. Neocortical Inhibitory System. *Folia Biol (Praha)* 2009. 55:201-217.
18. Meyer-Bernstein EL y Morin LP Destruction of serotonergic neurons in the median raphe nucleus blocks circadian rhythm phase shifts to triazolam but not to novel wheel access. *J Biol Rhythms.* 1998. 13(6); 494-505.
19. Feldman ML. Morphology of the neocortical neuron. En: *The Cerebral Cortex*, 1984. (editado por Peters, A y Jones, EG) Vol 1. Plenum Press, New York, pp 123-200.
20. Chang HT. Cortical neurons with particular reference to the apical dendrites. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1952. 17: 189-202.
21. Crick F Do dendritic spines twitch? *Trends Neurosci* 1982. 5: 44-6.
22. Diamond IT, Conley M, Itoh K, y Fitzpatrick D. Laminar organization of geniculocortical projections in *Galago senegalensis* and *Aotus trivirgatus*. *Journal of Comparative Neurology.* 1985 22; 242(4):584-610.
23. Fifková E y Delay RJ. Cytoplasmic actin in neuronal processes as a possible mediator of synaptic plasticity. *The Journal of Cell Biology.* 1982 1; 95(1):345-50.
24. Rall W y Segev I. Synaptic integration and excitable dendritic spine clusters: structure and function. En: *Intrinsic determinants of neuronal form and*

- function*, (editado por: Lasek RJ y Black MM). 1988. New York: Ed. Liss pp. 263-82.
25. Bannister AP Inter- and intra-laminar connections of pyramidal cells in the neocortex. *Neurosci Res.* 2005. 53: 95-103.
26. Fairén A, De Felipe J. y Regidor J Nonpyramidal neurons: general account. En *Cerebral cortex: cellular components of the cerebral cortex*. (editado por Peters A y Jones EG) Vol 1. 1984. Plenum Press, New York, pp 201-253.
27. The Petilla Interneuron Nomenclature Group (PING)* Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci.* 2008 9(7): 557–568.
28. VanLutterveld R, Sommer IE y Ford JM The neurophysiology of auditory hallucinations - a historical and contemporary review. Revisión. *Front Psychiatry.* 2011. 2:28.
29. Froemke RC, Debanne D y Bi GQ Temporal modulation of spike-timing-dependent plasticity. *Front Synaptic Neurosci.* 2010. 17:2-19.
30. Ji W, Gao E, Suga N. Effects of acetylcholine and atropine on plasticity of central auditory neurons caused by conditioning in bats. *Journal of Neurophysiology.* 2001 1; 86(1):211-25.
31. Ji W, Suga N y Gao E Effects of agonists and antagonists of NMDA and ACh receptors on plasticity of bat auditory system elicited by fear conditioning. *J Neurophysiol.* 2005. 94(2):1199-211.
32. Hu H, Real E, Takamiya K, Kang MG, Ledoux J, Huganir RL y Malinow R Emotion enhances learning via norepinephrine regulation of AMPA-receptor trafficking. *Cell.* 2007. 131(1):160-73

33. Winer JA, Sally SL, Larue DT y Kelly JB Origins of medial geniculate body projections to physiologically defined zones of rat primary auditory cortex. *Hear Res.* 1999. 130:42–61
34. Calvert GA y Thesen T Multisensory integration: methodological approaches and emerging principles in the human brain. *J Physiol.* 2004. 98:191-205.
35. Driver J y Spence C Multisensory perception: beyond modularity and convergence. *Curr Biol.* 2000. 10:731–735.
36. Thomson AM y Lamy C Functional maps of neocortical local circuitry. *Front Neurosci.* 2007. 1: 19-42.
37. Watkins, Jeffrey C y David E. Jane. “The Glutamate Story.” *British Journal of Pharmacology* 147 2006: S100–S108. PMC. Web. 1 noviembre. 2016.
38. Brady, Scott T, George J. Siegel, R W. Albers, y D L. Price. *Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular, and Medical Neurobiology.* ., Capítulo 17 Glutamate an glutamate receptors Hassel B. y Dingleline R. páginas 342-366 2012
39. Metherate, R., y Cruikshank, S. J. Thalamocortical inputs trigger a propagating envelope of gamma-band activity in auditory cortex in vitro. *Experimental Brain Research*, 1999. 126(2), 160-174.
40. Thomson, A. M., y Lamy, C. Functional maps of neocortical local circuitry. *Frontiers in neuroscience*, 2007. 1, 2
41. Hackett, T. A., Smiley, J. F., Ulbert, I., Karmos, G., Lakatos, P., de la Mothe, L. A., y Schroeder, C. E. Sources of somatosensory input to the caudal belt areas of auditory cortex. *Perception*, 2007. 36(10), 1419-1430.
42. Hackett TA. , Takahata T., y Balaram P. VGLUT1 and VGLUT2 mRNA expression in the primate auditory pathway. *Hear Res.* 2011; 274(1-2):129-41

- 43.. Barbour DL, Callaway EM. Excitatory local connections of superficial neurons in rat auditory cortex. *Journal of Neuroscience*. 2008 29;28(44):11174-85
- 44.Schachtele SJ, Losh J, Dailey ME, Green SH. Spine formation and maturation in the developing rat auditory cortex. *Journal of Comparative Neurology*. 2011 1; 519(16):3327-45.
- 45.Oswald AM, Reyes AD. Maturation of intrinsic and synaptic properties of layer 2/3 pyramidal neurons in mouse auditory cortex. *Journal of neurophysiology*. 2008 1;99(6):2998-3008
- 46.Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacological reviews*. 1994 1; 46(2):157-203.
- 47.Nichols DE, Nichols CD. Serotonin receptors. *Chemical reviews*. 2008 14; 108 (5):1614-41.
- 48.Kobilka B.K. G protein coupled receptor structure and activation *Biochimica et Biophysica Acta* 2007 ,1768794–80
- 49.Bockaert J, Pin JP. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *The EMBO journal*. 1999 1; 18(7):1723-9.
- 50.Zoli, Michele, y Luigi F. Agnati. "Wiring and volume transmission in the central nervous system: the concept of closed and open synapses." *Progress in neurobiology* 1996 49.4: 363-380.

51. Golding, David W. "A pattern confirmed and refined—synaptic, nonsynaptic and parasynaptic exocytosis." *Bioessays* 1994 16.7,: 503-508
52. Trueta, C., y M. G. Cercós. "Regulación de la liberación de serotonina en distintos compartimientos neuronales." *Salud mental* 2012 35.5,: 435-443.
53. Kosofsky, Barry E., y Mark E. Molliver. "The serotonergic innervation of cerebral cortex: different classes of axon terminals arise from dorsal and median raphe nuclei." *Synapse* 1987 1.2: 153-168.
54. Göthert, M. Role of autoreceptors in the function of the peripheral and central nervous system. *Arzneimittel-Forschung*, 1985. 35(12A), 1909-1916.
55. Davidson, C., y Stamford, J. A. Evidence that 5-hydroxytryptamine release in rat dorsal raphe nucleus is controlled by 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} and 5-HT_{1D} autoreceptors. *British journal of pharmacology*, 1995. 114(6), 1107-1109.
56. De Groote, L., Olivier, B., y Westenberg, H. G. Extracellular serotonin in the prefrontal cortex is limited through terminal 5-HT_{1B} autoreceptors: a microdialysis study in knockout mice. *Psychopharmacology* 2002, 162(4), 419-424.
57. Trillat, A. C., Malagie, I., Scarce, K., Pons, D., Anmella, M. C., Jacquot, C., y Gardier, A. M. Regulation of Serotonin Release in the Frontal Cortex and Ventral Hippocampus of Homozygous Mice Lacking 5-HT_{1B} Receptors: In Vivo Microdialysis Studies. *Journal of neurochemistry*, 1997. 69(5), 2019-2025.
58. Dawson, L. A., y Nguyen, H. Q. Effects of 5-HT_{1A} receptor antagonists on fluoxetine-induced changes in extracellular serotonin concentrations in rat frontal cortex. *European journal of pharmacology*, 1998. 345(1), 41-46.

59. Riad M, Garcia S, Watkins KC, Jodoin N, Doucet E, Langlois X, el Mestikawy S, Hamon M, Descarries L. Somatodendritic localization of 5-HT_{1A} and preterminal axonal localization of 5-HT_{1B} serotonin receptors in adult rat brain. *J Comp Neurol*. 2000; 417(2):181–194
60. Engel, G., Göthert, M., Hoyer, D., Schlicker, E., y Hillenbrand, K. (. Identity of inhibitory presynaptic 5-hydroxytryptamine (5-HT) autoreceptors in the rat brain cortex with 5-HT 1B binding sites. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 1986 332(1), 1-7.
61. Rudnick, G. Structure/function relationships in serotonin transporter: new insights from the structure of a bacterial transporter. In *Neurotransmitter transporters* Springer Berlin Heidelberg. 2006 (pp. 59-73).
62. Rudnick, G. Structure/function relationships in serotonin transporter: new insights from the structure of a bacterial transporter. *Neurotransmitter transporters*. Springer Berlin Heidelberg, 2006. 59-73
63. Kumagae, Yoshihiro, Yoshiki Matsui, y Nobuyoshi Iwata. "Deamination of norepinephrine, dopamine, and serotonin by type A monoamine oxidase in discrete regions of the rat brain and inhibition by RS-8359." *The Japanese Journal of Pharmacology* 55.1 1991: 121-128.
64. Adell, A., y Artigas, F. Differential effects of clomipramine given locally or systemically on extracellular 5-hydroxytryptamine in raphe nuclei and frontal cortex. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 1991. 343(3), 237-244.
65. Tao, R., y Ma, Z. How Much Serotonin in the CNS is Too Much?. In *When Things Go Wrong-Diseases and Disorders of the Human Brain*. 2012 InTech.

66. Bunin MA, y Wightman RM. Quantitative evaluation of 5-hydroxytryptamine (serotonin) neuronal release and uptake: an investigation of extrasynaptic transmission. *Journal of Neuroscience*. 1998 1; 18(13):4854-60.
67. Penington, N.J., Kelly, J.S. y Fox, A.P. Whole-cell recordings of inwardly rectifying K⁺ currents activated by 5-HT_{1A} receptors on dorsal raphe neurones of the adult rat. *J Physiol*, 1993. 469, 387-405
68. Goodfellow, N. M., Benekareddy, M., Vaidya, V. A., & Lambe, E. K. Layer II/III of the prefrontal cortex: inhibition by the serotonin 5-HT_{1A} receptor in development and stress. *Journal of Neuroscience*, 2009. 29(32), 10094-10103.
69. Aghanian G.K y Marek G.J Serotonin induces excitatory postsynaptic potentials in apical dendrites of neocortical pyramidal cells *Neuropharmacology* vol 3 No 4/5 pp 1997, 589-599
70. Lidov HG, Grzanna R, Molliver ME. The serotonin innervation of the cerebral cortex in the rat—an immunohistochemical analysis. *Neuroscience*. 1980 29; 5(2):207-27.
71. D'Amato RJ, Blue ME, Largent BL, Lynch DR, Ledbetter DJ, Molliver ME, Snyder SH. Ontogeny of the serotonergic projection to rat neocortex: transient expression of a dense innervation to primary sensory areas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1987 1; 84(12):4322-6.

72. Harper MS, Wallace MN. Changes in density of brainstem afferents in ferret primary auditory cortex (AI) during postnatal development. *Journal of anatomy*. 1995; 186 (Pt 2):373.
73. Vu DH, Törk I. Differential development of the dual serotonergic fiber system in the cerebral cortex of the cat. *Journal of Comparative Neurology*. 1992 8; 317 (2):156-74.
74. Basura, G. J., Abbas, A. I., O'Donohue, H., Lauder, J. M., Roth, B. L., Walker, P. D., y Manis, P. B. (Ontogeny of Serotonin and Serotonin_{2A} Receptors in Rat Auditory Cortex. *Hearing Research*, 2008. 244(1-2), 45–50.
75. Leonard, B. E. Evidence for a biochemical lesion in depression. *The Journal of clinical psychiatry*, 61(suppl 6), 2000. 12-17.
76. Zhang Z. Serotonin Induces Tonic Firing in Layer V Pyramidal Neurons of Rat Prefrontal Cortex during Postnatal Development. *The Journal of Neuroscience*, 23(8): 2003 3373–3384
77. Cai, X., Gu, Z., Zhong, P., Ren, Y., y Yan, Z. Serotonin 5-HT_{1A} receptors regulate AMPA receptor channels through inhibiting Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II in prefrontal cortical pyramidal neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 2002 277(39), 36553-36562.
78. Deng, P. Y., Poudel, S. K. S., Rojanathammanee, L., Porter, J. E., y Lei, S.. Serotonin inhibits neuronal excitability by activating two-pore domain k⁺

- channels in the entorhinal cortex. *Molecular pharmacology*, 2007 72(1), 208-218.
79. Cox, C. L., Metherate, R., y Ashe, J. H. Modulation of cellular excitability in neocortex: Muscarinic receptor and second messenger-mediated actions of acetylcholine. *Synapse*, 1994 16(2), 123-136.
80. Metherate, R., y Ashe, J. H. Synaptic interactions involving acetylcholine, glutamate, and GABA in rat auditory cortex. *Experimental brain research*, 1995. 107(1), 59-72.
81. Krnjević, K., y Phillis, J. W. Actions of certain amines on cerebral cortical neurones. *British Journal of Pharmacology*, 1963. 20(3), 471-490.
82. Béïque, J. C., Imad, M., Mladenovic, L., Gingrich, J. A., y Andrade, R.. Mechanism of the 5-hydroxytryptamine 2A receptor-mediated facilitation of synaptic activity in prefrontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007 104(23), 9870-9875.
83. Ahveninen, J., Kähkönen, S., Pennanen, S., Liesivuori, J., Ilmoniemi, R. J., & Jääskeläinen, I. P. Tryptophan depletion effects on EEG and MEG responses suggest serotonergic modulation of auditory involuntary attention in humans. *Neuroimage*, 2002. 16(4), 1052-1061.
84. Stark, H., y Scheich, H. Dopaminergic and serotonergic neurotransmission systems are differentially involved in auditory cortex learning: a long-term microdialysis study of metabolites. *Journal of Neurochemistry*, 1997. 68(2), 691-697.
85. Ji, W. y Suga, N. Cortical tone-specific plasticity elicited by conditioning and cortical non-specific plasticity elicited by pseudo conditioning depend on

different neuromodulators. Prog.No. 174.4. En 2007 “Neuroscience Meeting Planner. Society for Neuroscience”, Washington DC. 2007

86. Simmons, J. G., Nathan, P. J., Berger, G., y Allen, N. B. Chronic modulation of serotonergic neurotransmission with sertraline attenuates the loudness dependence of the auditory evoked potential in healthy participants. *Psychopharmacology*, 2011 217(1) 101-110.
87. Dringenberg, H. C., Branfield Day, L. R., y Choi, D. H. Chronic fluoxetine treatment suppresses plasticity (long-term potentiation) in the mature rodent primary auditory cortex in vivo. *Neural plasticity*, 2014.
- 88.- Lee, C. C., y Sherman, S. M. Modulator property of the intrinsic cortical projection from layer 6 to layer 4. *Frontiers in systems neuroscience*, 3 2009:3.
- 89.- Tao, H. W., y Poo, M. M. Activity-dependent matching of excitatory and inhibitory inputs during refinement of visual receptive fields. *Neuron*, 45(6) (2005). 829-836.
90. Celada, P., Bortolozzi, A., y Artigas, F. Serotonin 5-HT_{1A} receptors as targets for agents to treat psychiatric disorders: rationale and current status of research. *CNS drugs*, 2013 27(9), 703-716.
91. Mitzdorf, U. Current source-density method and application in cat cerebral cortex: investigation of evoked potentials and EEG phenomena. 1985
92. Vaughan HG, Arezzo J.C. The neural basis of event related potentials. In EEG Handbook (Vol. 3), Picton TW (ed.). Amsterdam: Elsevier 1988; 45–96.
93. Hegerl, U., y Juckel, G. Intensity dependence of auditory evoked potentials as an indicator of central serotonergic neurotransmission: a new hypothesis. *Biological psychiatry*, 1993. 33(3), 173-187.

94. Atzori, M., et al. "Dopamine prevents muscarinic-induced decrease of glutamate release in the auditory cortex." *Neuroscience* 134.4 2005: 1153-1165.
95. Salgado, H., Bellay, T., Nichols, J. A., Bose, M., Martinolich, L., Perrotti, L., y Atzori, M. Muscarinic M2 and M1 receptors reduce GABA release by Ca²⁺ channel modulation through activation of PI3K/Ca²⁺-independent and PLC/Ca²⁺-dependent PKC. *Journal of Neurophysiology* 2007 98(2), 952-965.
96. Salgado, H., García-Oscos, F., Dinh, L., y Atzori, M. Dynamic modulation of short-term synaptic plasticity in the auditory cortex: the role of norepinephrine. *Hearing research*, 2011 271(1), 26-36.
97. G. Paxinos y C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition Academic Press Sexta edición*. 2006 456 páginas
98. - Salgado, H., Garcia-Oscos, F., Martinolich, L., Hall, S., Restom, R., Tseng, K. Y. y Atzori, M. Pre-and postsynaptic effects of norepinephrine on γ -aminobutyric acid-mediated synaptic transmission in layer 2/3 of the rat auditory cortex. *Synapse*, 2012. 66(1), 20-28.
99. Igelström, K. M., y Heyward, P. M. Inhibition of hippocampal excitability by citalopram. *Epilepsia*, 2012. 53(11), 2034-2042.
100. Deng, Pan-Yue, y S. Lei. "Serotonin increases GABA release in rat entorhinal cortex by inhibiting interneuron TASK-3 K⁺ channels." *Molecular and Cellular Neuroscience* 2008 39.2: 273-284.

101. Penington NJ, Kelly JS, Fox AP. A study of the mechanism of Ca^{2+} current inhibition produced by serotonin in rat dorsal raphe neurons. *J Neurosci.* 1991; 11: 3594–3609.
102. Bayliss DA, Li YW, y Talley EM. Effects of serotonin on caudal raphe neurons: inhibition of N- and P/Q-type calcium channels and the afterhyperpolarization. *J Neurophysiol.* 1997; 77: 1362–1374.
103. Fritze, Stefan, Rainer Spanagel, y Hamid R. Noori. "Adaptive dynamics of the 5-HT systems following chronic administration of selective serotonin reuptake inhibitors: a meta-analysis." *Journal of neurochemistry* 2017 142.5: 747-755.
104. Nozaki, K., Kubo, R., y Furukawa, Y. Serotonin modulates the excitatory synaptic transmission in the dentate granule cells. *Journal of neurophysiology*, 2016 115(6), 2997-3007.
105. Zhong, P., Yuen, E. Y., y Yan, Z. Modulation of neuronal excitability by serotonin-NMDA interactions in prefrontal cortex. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 2008. 38(2), 290-299.
106. Yang, Y. C., Hu, C. C., Huang, C. S., y Chou, P. Y. Thalamic synaptic transmission of sensory information modulated by synergistic interaction of adenosine and serotonin. *Journal of neurochemistry*, 2014. 128(6), 852-863.
107. Oostland, M., Buijink, M. R., Teunisse, G. M., von Oerthel, L., Smidt, M. P., y van Hooft, J. A. Distinct temporal expression of 5-HT 1A and 5-HT 2A receptors on cerebellar granule cells in mice. *The Cerebellum*, 2014. 13(4), 491-500.

108. Hu, L., Liu, C., Dang, M., Luo, B., Guo, Y., y Wang, H. Activation of 5-HT_{2A/2C} receptors reduces the excitability of cultured cortical neurons. *Neuroscience letters*, 2016. 632, 124-129
109. Aghajanian, G. K., y Marek G. J. Serotonin, via 5-HT_{2A} receptors, increases EPSCs in layer V pyramidal cells of prefrontal cortex by an asynchronous mode of glutamate release. *Brain Research*, 1999. 825(1), 161-171.
110. Sheldon, P. W., & Aghajanian, G. K. Serotonin (5-HT) induces IPSPs in pyramidal layer cells of rat piriform cortex: evidence for the involvement of a 5-HT₂-activated interneuron. *Brain research*, 1990. 506(1), 62-69.
111. Liu, Z., Bunney, E. B., Appel, S. B., y Brodie, M. S. Serotonin reduces the hyperpolarization-activated current (I_h) in ventral tegmental area dopamine neurons: involvement of 5-HT₂ receptors and protein kinase C. *Journal of neurophysiology* 2003, 90(5), 3201-3212.
112. Raymond, J. R., Mukhin, Y. V., Gettys, T. W., y Garnovskaya, M. N.. The recombinant 5-HT_{1A} receptor: G protein coupling and signalling pathways. *British journal of pharmacology* 1999, 127(8), 1751-1764.
113. Aghajanian, G. K., y Lakoski, J. M. Hyperpolarization of serotonergic neurons by serotonin and LSD: studies in brain slices showing increased K⁺ conductance. *Brain research*, 1984 305(1), 181-185.
114. Lüscher, C., Jan, L. Y., Stoffel, M., Malenka, R. C., y Nicoll, R. A. G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron*, 1997 19(3), 687-695.

115. Williams, J. T., Colmers, W. F., y Pan, Z. Z... Voltage-and ligand-activated inwardly rectifying currents in dorsal raphe neurons in vitro. *Journal of Neuroscience*, 1988 8(9), 3499-3506.
116. Hamid, E., Church, E., Wells, C. A., Zurawski, Z., Hamm, H. E., y Alford, S. Modulation of neurotransmission by GPCRs is dependent upon the microarchitecture of the primed vesicle complex. *Journal of Neuroscience*, 2014 34(1), 260-274.
117. Feng, J., Cai, X., Zhao, J., y Yan, Z. Serotonin receptors modulate GABAA receptor channels through activation of anchored protein kinase C in prefrontal cortical neurons. *Journal of Neuroscience*, 2001 21(17), 6502-6511.
118. Ashby, C. R., Jiang, L. H., Kasser, R. J., y Wang, R. Y.. Electrophysiological characterization of 5-hydroxytryptamine₂ receptors in the rat medial prefrontal cortex. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1990, 252(1), 171-17
119. Bright, D., y Smart, T. G. Methods for recording and measuring tonic GABAA receptor-mediated inhibition. *Frontiers in neural circuits*, 2013. 7, 193.
120. Krishek, B. J., Xie, X., Blackstone, C., Huganir, R. L., Moss, S. J., y Smart, T. G.. Regulation of GABAA receptor function by protein kinase C phosphorylation. *Neuron* 1994, 12(5), 1081-1095.
121. Santana N, Bortolozzi A, Serrats J, Mengod G y Artigas F. Expression of serotonin_{1A} and serotonin_{2A} receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cerebral cortex*. 2004 1; 14 (10):1100-9.

122. Puig, M. V., y Gullledge, A. T. Serotonin and prefrontal cortex function: neurons, networks, and circuits. *Molecular neurobiology*, 2011 44(3), 449-464.
123. Akhmetshina, D., Zakharov, A., Vinokurova, D., Nasretdinov, A., Valeeva, G., y Khazipov, R. The serotonin reuptake inhibitor citalopram suppresses activity in the neonatal rat barrel cortex in vivo. *Brain research bulletin*, 2016. 124, 48-54.
124. Bassant MH, Ennouri K, y Lamour Y. Effects of iontophoretically applied monoamines on somatosensory cortical neurons of unanesthetized rats. *Neuroscience*. 1990 1; 39(2):431-9.
125. Ebert, U. y Ostwald, J. Serotonin modulates auditory information processing in the cochlear nucleus of the rat. *Neuroscience letters*, 1992. 145(1), 51-54.
126. Rauch, A., Rainer, G., y Logothetis, N. K. The effect of a serotonin-induced dissociation between spiking and perisynaptic activity on BOLD functional MRI. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008. 105(18), 6759-6764.
127. Seillier, L., Lorenz, C., Kawaguchi, K., Ott, T., Nieder, A., Pourriahi, P., y Nienborg, H. Serotonin decreases the gain of visual responses in awake macaque V1. *Journal of Neuroscience*, 2017. 1339-17.
128. Waterhouse, B. D., Azizi, S. A., Burne, R. A., y Woodward, D. J. Modulation of rat cortical area 17 neuronal responses to moving visual stimuli during norepinephrine and serotonin microiontophoresis. *Brain research*, 1990. 514(2), 276-292.
129. Nathan, P. J., Segrave, R., Phan, K. L., O'Neill, B., y Croft, R. J. Direct evidence that acutely enhancing serotonin with the selective serotonin reuptake inhibitor citalopram modulates the loudness dependence of the

auditory evoked potential (LDAEP) marker of central serotonin function. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*, 2006 21(1), 47-52.

130. DeRubeis RJ, Hollon SD, Amsterdam JD, Shelton RC, Young PR, Salomon RM, et al. Cognitive therapy vs. medications in the treatment of moderate to severe depression. *Arch. Gen. Psychiat.* 2005; 62:409–436.