



*Caracterización de un cultivo primario
de romboencéfalo enriquecido en
neuronas serotoninérgicas*



*Tesis de grado en Licenciatura en
Ciencias Biológicas
Opción Neurociencias*

2015

Eugenia Saiz

Tutora: Patricia Lagos

Co-tutora: Giselle Prunell

Índice

Índice	2
Resumen	4
Introducción	5
2. Sistema serotoninérgico	8
2.1. Sistema serotoninérgico y la depresión mayor	10
2.3. Núcleo dorsal del rafe	11
2.4. Ontogenia del sistema serotoninérgico	12
3. Cultivo primario como herramienta para el estudio de la fisiología de sistemas de neurotransmisión in vitro	13
3.1. Cultivo primario de neuronas romboencefálicas	14
4. Métodos de cuantificación de serotonina	15
Hipótesis	16
Objetivo general	16
Objetivos específicos	16
Metodología	17
1. Cortes en parafina	17
2. Cortes a congelación	18
3. Inmunohistoquímica	18
4. Cultivo primario enriquecido en neuronas serotoninérgicas	18
5. Detección de los diferentes fenotipos celulares en cultivo	19
5.1. Protocolo básico de inmunofluorescencia	19
5.2. Protocolo modificado para la detección de NeuN por microscopía de luz	20
5.3. Protocolo modificado para la detección de neuronas GABAérgicas	20
5.4. Análisis de los ensayos de inmunofluorescencia	21
6. Cuantificación de los niveles de serotonina en cultivo por HPLC-ED	22
7. Análisis de datos	23
Resultados	24
1. Localización de los núcleos del rafe en embrión de rata E14	24
2. Localización de las neuronas serotoninérgicas en embrión de rata E14	24
.....	25
3. Cultivos 7 DIV	25
3.1. Cuantificación de las neuronas serotoninérgicas	25
3.2. Detección de otros fenotipos neuronales	27

3.3. Cuantificación de los niveles de serotonina por HPLC-ED.	28
4. Cultivos 14 DIV.	28
4.1. Cuantificación de las neuronas serotoninérgicas y otros fenotipos neuronales.	28
4.2. Detección de otros fenotipos neuronales.	29
4.3. Cuantificación de los niveles basales de serotonina por HPLC-ED.	30
4.4. Cuantificación de los niveles de serotonina y 5-HIAA luego del tratamiento con KCl.	32
4.5. Cuantificación de los niveles de serotonina y 5-HIAA luego del tratamiento con citalopram.	33
Discusión.....	34
1. Caracterización del cultivo primario de romboencéfalo.	34
2. Cuantificación de niveles basales de serotonina.	35
3. Estimulación farmacológica del sistema serotoninérgico.	36
Conclusiones.....	37
Perspectivas.....	38
Referencias bibliográficas.	39
Anexo 1: soluciones.	42
1. Cultivos de romboencéfalo.....	42
1.1. Medio de cultivo Neurobasal 1X:	42
1.2. B27:	43
1.3. Buffer de Krebs- Ringer Glucosa-Hepes (KBH) (10 X)	43
2. Soluciones utilizadas para la cuantificación de serotonina y 5-HIAA por HPLC-ED.....	44
2.1. Fase móvil HPLC-ED.....	44
2.2. Solución estándar de serotonina y 5-HIAA.....	44
Anexo 2: datos.....	45
1. Cuantificación de las neuronas serotoninérgicas en cultivo de 7 DIV.	45
2. Cuantificación de las neuronas serotoninérgicas en cultivo de 14 DIV.	45
3. Niveles de 5-HIAA en respuesta a la estimulación con citalopram en cultivo de 14 DIV.	45
4. Niveles de 5-HT en respuesta a la estimulación con citalopram en cultivo de 14 DIV.	46

Resumen.

Diversas evidencias han mostrado que una disminución en los niveles de serotonina se relacionan con comportamientos depresivos en humanos, por lo que resulta de relevancia poseer un sistema *in vitro* para estudiar la fisiología de las neuronas serotoninérgicas. Por ello, el objetivo principal de este trabajo fue caracterizar fenotípicamente un cultivo primario de romboencéfalo obtenido de rata en la etapa embrionaria E14 enriquecido en neuronas serotoninérgicas, y cuantificar los niveles de serotonina basales y en respuesta a la estimulación farmacológica. Para ello, primero fue necesario la puesta a punto del establecimiento de cultivos primarios de romboencéfalo con especial énfasis en el enriquecimiento en neuronas serotoninérgicas. Posteriormente se realizaron técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia para la caracterización fenotípica del cultivo. Así, se realizaron diferentes protocolos para poner en evidencia la presencia de neuronas, glías y los fenotipos neuronales serotoninérgicos, catecolaminérgicos y GABAérgicos. Para caracterizar la fisiología del sistema serotoninérgico, se cuantificaron los niveles intracelulares y extracelulares de serotonina en dichos cultivos por cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica (HPLC-ED) en situación basal (control) y luego del tratamiento con cloruro de potasio (KCl) y un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (ISRS), citalopram.

Nuestros resultados muestran que el cultivo primario de romboencéfalo de rata en E14 a los 14 días *in vitro* (DIV) posee aproximadamente un 2% de neuronas serotoninérgicas y que se encuentra funcionalmente activo ya que pudieron ser cuantificados tanto los niveles basales de serotonina como los de su principal metabolito, el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA). Además responde en forma óptima a la estimulación farmacológica con KCl, aumentando los niveles de serotonina extracelulares y en particular, responde frente al citalopram una droga específica del sistema serotoninérgico que promueve el aumento de los niveles de serotonina extracelulares.

Por tanto, este sistema *in vitro* parece ser una herramienta experimental apropiada para el estudio y modulación del sistema serotoninérgico.

Introducción.

1. Serotonina

La serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) es una monoamina biogénica (figura 1), aislada e identificada en 1948 por Rapport, Green y Page, como el factor vasoconstrictor tónico del suero, liberado por las plaquetas durante la coagulación de la sangre. Independientemente, Esparmer caracterizó a una sustancia que se encontraba en grandes cantidades en las células enterocromafines del tracto gastrointestinal, con efectos vasoconstrictores en el músculo liso, y la llamó “enteramina”. Posteriormente se confirmó que la serotonina y la enteramina eran la misma sustancia, y se detectó su presencia en extractos de cerebro. Por lo tanto, la serotonina se identificó en tres sistemas principales del cuerpo: las plaquetas, el tracto gastrointestinal y el cerebro. En el cerebro de mamíferos, la serotonina es uno de los neurotransmisores/neuromoduladores más importante [1].

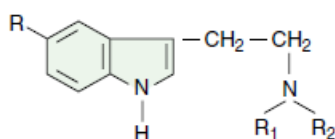


Figura 1. Estructura química de la serotonina. Tomado de Basic Neurochemistry, 2012.

Biosíntesis. El paso inicial en la biosíntesis de la serotonina, es el transporte facilitado del aminoácido L-triptófano desde la sangre al cerebro. La fuente primaria de triptófano es la proteína de la dieta. Las neuronas serotoninérgicas contienen la enzima triptófano hidroxilasa (TPH), la cual convierte triptófano en 5-hidroxitriptófano (figura 2). Esta enzima es sintetizada en los cuerpos celulares serotoninérgicos de los núcleos del rafe y se encuentra solamente en las células que sintetizan serotonina, siendo la enzima limitante de su síntesis. La serotonina se sintetiza a partir del 5-hidroxitriptófano por la enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC); esta enzima no es exclusiva de neuronas serotoninérgicas y también se encuentra en neuronas catecolaminérgicas [1].

Liberación. La serotonina es almacenada en vesículas para su posterior liberación a través de un mecanismo exocitótico. Además, recientemente se ha demostrado que las neuronas serotoninérgicas de los núcleos del rafe (núcleos enriquecidos en neuronas

serotoninérgicas), liberan serotonina del pool citoplasmático por difusión simple a través de la membrana celular [2].

Degradación. La degradación de la serotonina es catalizada por la enzima monoamino oxidasa (MAO), una flavoproteína integral de las membranas mitocondriales externas en las neuronas, glía y otras células. MAO cataliza la desaminación oxidativa de la serotonina mediante su conversión en 5-hidroxi-indolacetaldehído (5-HIAL), que se procesa adicionalmente en 5-HIAA por la aldehído dehidrogenasa NAD⁺-dependiente (ALDH). MAO también cataboliza la degradación de otros neurotransmisores monoaminérgicos tales como norepinefrina y dopamina, y también trazas de aminos. Han sido identificadas dos isoenzimas de la MAO, denominados A y B, las cuales difieren en sus bases genéticas, la regulación transcripcional, la preferencia de sustrato, de inhibidores de afinidad y en su distribución regional. Aunque MAO A exhibe la más alta preferencia por la serotonina y cataliza su metabolismo en condiciones fisiológicas, MAO B es la principal isoenzima que ha sido identificada en las neuronas serotoninérgicas y tiene otros sustratos preferenciales [3]. Esto ha llevado a la hipótesis de que la MAO B en las neuronas serotoninérgicas evita que la célula acumule sustratos naturales (por ejemplo, dopamina) que podrían interferir con el almacenamiento, la liberación y la recaptación de la serotonina. Por tanto, la isoenzima MAO A es la encargada de degradar la serotonina [1].

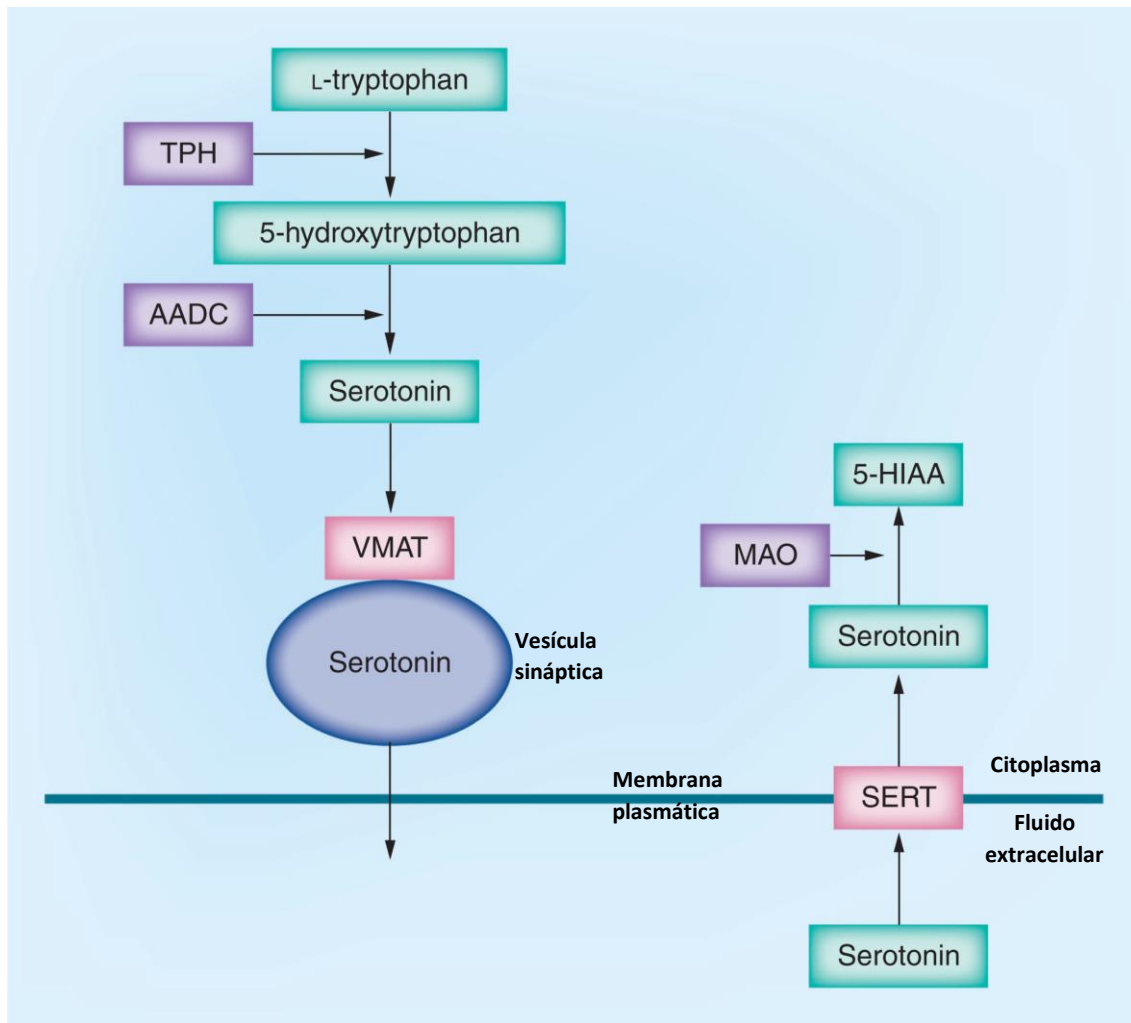


Figura 2. Biosíntesis y catabolismo de la serotonina. 5-HIAA: ácido 5 hidroxiindolacético; AADC: descarboxilasa de aminoácidos aromáticos; MAO: monoamino oxidasa; SERT: transportador de serotonina; TPH: triptófano hidroxilasa; VMAT: transportador vesicular de monoaminas. Tomado y modificado de Chugani, 2011.

Almacenamiento. Como se mencionó anteriormente, la serotonina es almacenada en vesículas y liberada a la hendidura sináptica por un mecanismo exocitótico. El transportador vesicular de monoaminas (VMAT) utiliza el gradiente electroquímico generado por la enzima H^+ -ATPasa para dirigir el transporte de la serotonina a las vesículas sinápticas [1]. La presencia de dichas vesículas de almacenamiento se ha demostrado además, en los cuerpos celulares, dendritas y más recientemente en varicosidades axonales de neuronas serotoninérgicas. Por lo tanto, en teoría, la liberación de serotonina podría ocurrir en cualquier sector de las neuronas serotoninérgicas [2].

Actividad sináptica. Tras su liberación del terminal sináptico, la serotonina difunde a la hendidura sináptica y ejerce sus efectos a través de receptores sinápticos y extrasinápticos. Los receptores serotoninérgicos son del tipo metabotrópico y ionotrópico. Los de tipo ionotrópico pertenecen a una única familia: 5-HT₃ y son canales iónicos permeables al Na^+ y K^+ . Los receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G

presentan siete dominios transmembrana, y se pueden clasificar en cuatro grupos de acuerdo al sistema principal de segundo mensajero: los receptores 5-HT₁ acoplados a proteínas G_{ai} / G_{ao} (5-HT_{1A}, 5-T_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F}); los receptores 5-HT₂ acoplados a proteínas G_{αq} (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}); los 5-HT₄, 5-HT₆ y 5-HT₇ receptores acoplados a proteínas G_s; y los receptores 5-HT₅ (5-HT_{5A} y 5-HT_{5B}) para los que el acoplamiento a proteínas G es todavía incierto [4]. Aunque cada tipo de receptor puede ser potencialmente activado por serotonina, presentan diferencias en su distribución neuroanatómica y en las afinidades por la serotonina y agonistas y antagonistas [1].

Luego de producir sus efectos sobre los receptores, la serotonina es recaptada en el terminal sináptico por el transportador selectivo de la recaptación de serotonina (SERT) y metabolizado por la MAO A a 5-HIAA (figura 3). SERT se localiza en las neuronas serotoninérgicas, más específicamente perisinápticamente y a lo largo de los axones y dendritas. El ARNm para SERT ha sido localizado en el cerebro exclusivamente en los núcleos del rafe, y su actividad regula la concentración de serotonina en la sinapsis, y de este modo modula la transmisión sináptica. El sistema de recaptación para serotonina es saturable y de alta afinidad, con una K_m de aproximadamente 0,2-0,5 μmol/l, y es un proceso activo temperatura-dependiente [1].

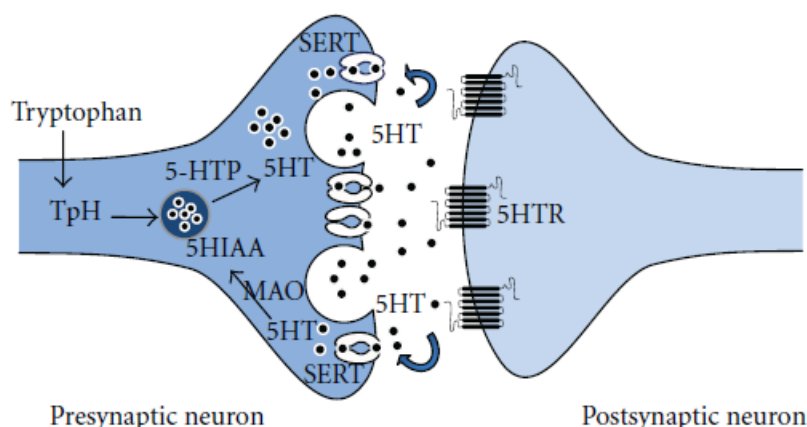


Figura 3. Esquema del terminal sináptico de una neurona serotoninérgica. MAO A se distribuye fundamentalmente en el terminal sináptico, donde degradará la serotonina luego de ser recaptada por el transportador SERT. Tomado de Buller et al., 2012.

2. Sistema serotoninérgico.

En mamíferos, el sistema serotoninérgico está conformado por neuronas que contienen serotonina localizadas a lo largo de la línea media del tronco encefálico. Sin embargo sus axones inervan casi todas las áreas del sistema nervioso central (SNC) (figura 4). Existen 9 grupos de cuerpos celulares que contienen serotonina, los cuales son designados como B1 a B9 (de acuerdo a Dahlstrom y Fuxe, 1964 [5]) y corresponden, la

mayoría de ellos, a los núcleos del rafe. Sin embargo, algunos cuerpos celulares se encuentran fuera del rafe, y a su vez, no todos los cuerpos celulares del rafe son serotoninérgicos. El grupo más grande de células serotoninérgicas es el grupo B7 contiguo al grupo B6 (más pequeño). B7 y B6, se consideran en conjunto el núcleo dorsal del rafe (NDR), localizado en el romboencéfalo. El NDR contiene el mayor número de neuronas serotoninérgicas del SNC de mamíferos, sin embargo, solamente entre el 40 y 50% del total de los cuerpos celulares son serotoninérgicos. Los grupos B8 y B5 corresponden al núcleo medial del rafe (NMR), mientras que el grupo B9, forma parte del tegmento ventrolateral de la protuberancia y del mesencéfalo, y por tanto, no se considera uno de los núcleos mediales. Los otros núcleos, de B1 a B4, se encuentran situados más caudalmente y contienen un pequeño número de células serotoninérgicas [1].

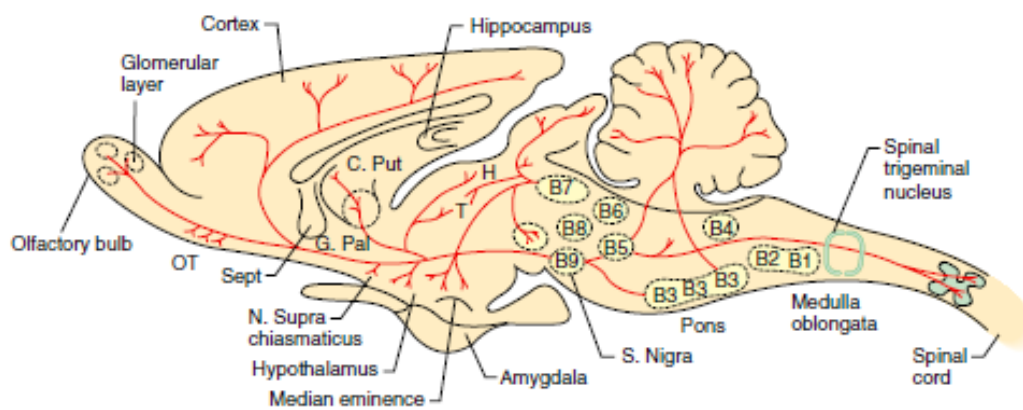


Figura 4. Dibujo esquemático que representa la localización de los grupos de somas serotoninérgicos y sus principales proyecciones en un esquema de un corte sagital del SNC de rata adulta, tomado de Basic Neurochemistry, 2012.

Un gran número de estudios muestran que el sistema serotoninérgico está involucrado en la regulación de funciones fisiológicas básicas tales como la secreción hormonal, la regulación del ciclo sueño-vigilia, principalmente del sueño REM (*rapid eyes movement*: movimiento ocular rápido), el control motor, el funcionamiento del sistema inmune, la nocicepción y la ingesta de alimentos. Además, la serotonina participa en las funciones cerebrales superiores, como la cognición y los estados emocionales, mediante la modulación de la plasticidad sináptica, y como ha sido descubierto recientemente, de la neurogénesis [6]. Asimismo, ha sido ampliamente reportada su implicancia en la fisiopatología de la depresión mayor [7], [8], [9].

2.1. Sistema serotoninérgico y la depresión mayor.

Diversas evidencias apuntan a una importante participación del sistema serotoninérgico en la depresión mayor, una de las enfermedades psiquiátricas más prevalentes de la población mundial [10]. En este sentido han sido encontrados niveles bajos de serotonina y/o de su principal metabolito 5-HIAA en la orina y el líquido cefalorraquídeo de pacientes con depresión mayor [7],[11]. En relación a la susceptibilidad al suicidio, han sido descritas en pacientes modificaciones en los receptores serotoninérgicos, en las proteínas recaptadoras de serotonina y otras alteraciones de la neurotransmisión serotoninérgica [8],[9].

El sistema serotoninérgico es el blanco terapéutico de la mayoría de las drogas antidepresivas cuyo mecanismo de acción es la inhibición de los SERT, como por ejemplo el citalopram, la fluoxetina y la fluvoxamina, denominados inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) [12],[13]. Los ISRS al inhibir a estos transportadores (los SERT) impiden que la serotonina sea recaptada al terminal sináptico y por lo tanto promueven su acumulación en la hendidura sináptica (figura 5), lo que estaría asociado a los efectos terapéuticos antidepresivos observados en la clínica [12].

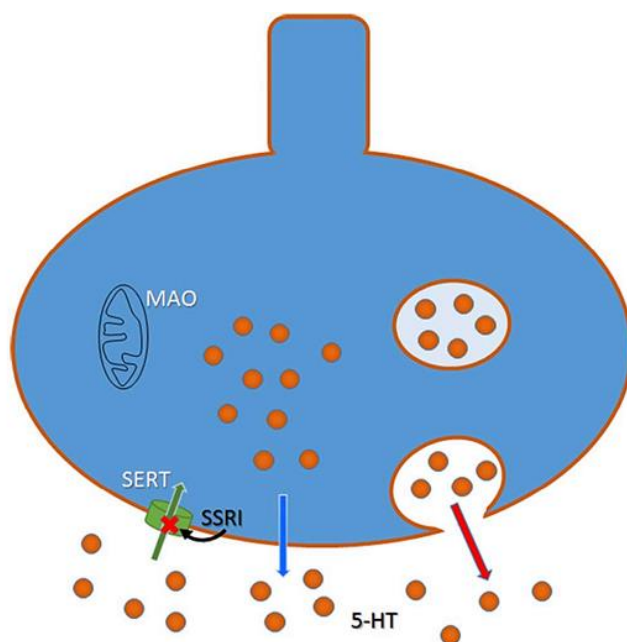


Figura 5. Dibujo esquemático de una neurona serotoninérgica que muestra la liberación exocitótica desde las vesículas (flechas rojas) y la liberación no-excitotóxica (flecha azul). La recaptación a través de SERT se representa con una flecha verde. SSRI: inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina. Tomado de Adell, 2015.

Además, existen evidencias de que pacientes depresivo-suicidas muestran una diferencia significativa en marcadores serotoninérgicos dentro del NDR en comparación con individuos control. Por ejemplo, Asberg et al (1976), reportaron una reducción en la concentración de serotonina y 5-HIAA en el fluido cefalorraquídeo de personas

depresivo-suicidas[14] .Por lo tanto, se ha sugerido que una disfunción en las neuronas serotoninérgicas del NDR podría estar implicada en la fisiopatología de la depresión mayor [15],[16].

2.3. Núcleo dorsal del rafe.

Como fue dicho anteriormente, existen múltiples tipos de células con distintos fenotipos neuroquímicos en el NDR. Además de las células serotoninérgicas se han descrito neuronas glutamatérgicas, GABAérgicas y dopaminérgicas, y estos neurotransmisores así como la serotonina pueden encontrarse co-localizando con diferentes neuropéptidos [17], como el factor de liberación de corticotropina, la sustancia P, la galanina, neurotensina y dinorfina [18].

La actividad sináptica del NDR está finamente modulada por la interacción compleja de la neurotransmisión excitatoria glutamatérgica e inhibitoria GABAérgica, proveniente de áreas extra rafe así como de fuentes locales (figura 6). Los axones glutamatérgicos que se originan en áreas extra rafe, incluyen el hipotálamo y la corteza prefrontal entre otras regiones. Los axones GABAérgicos que inervan el NDR se originan en fuentes extrínsecas como el hipotálamo lateral y rostral, la sustancia nigra o el área tegmental ventral. Las neuronas GABAérgicas locales residen tanto en el NDR y lateralmente dentro de la sustancia gris periacueductal adyacente [17].

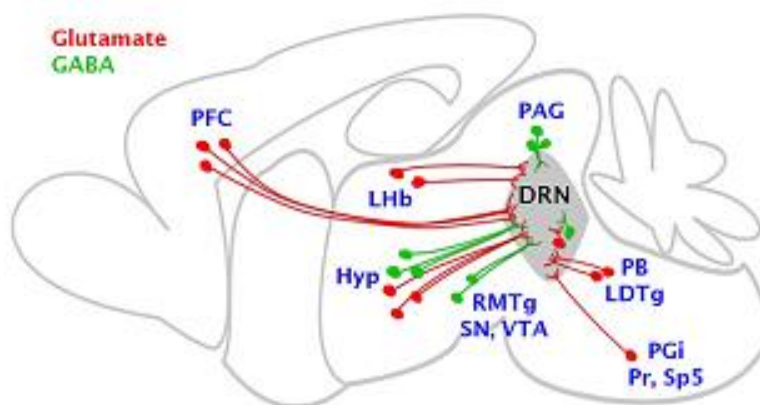


Figura 6. Esquema de un corte sagital de cerebro de rata, donde se describen las principales fuentes de las proyecciones glutamatérgicas y GABAérgicas al núcleo dorsal del rafe (DRN: dorsal raphe nclei). Las células glutamatérgicas (en rojo) se encuentran localizadas fundamentalmente en la corteza prefrontal (PFC), hipófisis lateral (LHb), hipotálamo (Hyp), núcleo parabraquial (PB), núcleo tegmental laterodorsal (LDTg), núcleo paragigantocelular (PGi), así como en fuentes locales que incluyen el NDR. Las proyecciones de las células GABAérgicas (en verde) al NDR se localizan principalmente en el hipotálamo, sustancia nigra (SN), área tegmental ventral (VTA) y localmente dentro de la sustancia gris periacueductal (PAG) y NDR. Tomado de Soiza-Reilly and Commons, 2014.

La liberación de serotonina en el NDR también está regulada por la presencia de autoreceptores serotoninérgicos. Estos receptores pueden tener diferentes localizaciones en las neuronas serotoninérgicas: los 5-HT_{1A} se encuentran en la zona somatodendrítica, mientras que los 5-HT_{1B} /1D pueden estar en axones colaterales recurrentes y en las terminales sinápticas. Los subtipos de receptores 5-HT₁ median la inhibición de la liberación de serotonina [19].

También existen evidencias de la implicancia de los receptores 5-HT₃ en la liberación de serotonina en el NDR. Los receptores 5-HT₃ pueden estar situados en las dendritas proximales, en los árboles dendríticos o en el cuerpo celular con una organización extrasináptica. Los receptores 5-HT₃ estimulan la liberación vesicular exocitótica de serotonina mediada por el funcionamiento en modo inverso del transportador SERT, y también por una estimulación por retroalimentación de la liberación de serotonina en el NDR [19]. Cuando se activa el receptor 5-HT₃, el canal iónico del mismo, permeable al Na⁺, K⁺ y Ca²⁺, se abre y la entrada de Na⁺ da lugar a la despolarización de la membrana local [20]. El consiguiente aumento de la concentración de Na⁺ resulta en el funcionamiento en modo inverso del SERT lo que produce la consiguiente salida de serotonina del pool citoplasmático a la hendidura sináptica. Además, la despolarización de la membrana evoca la apertura de canales de Ca²⁺ sensibles al voltaje y la elevada entrada de Ca²⁺ conducirá a la liberación exocitótica de serotonina del pool vesicular, que se suma a la liberación de serotonina inducida por el funcionamiento inverso del SERT [21].

El sistema serotoninérgico puede ser, por tanto, modulado farmacológicamente a través de la interacción de fármacos agonistas y antagonistas de autorreceptores y heterorreceptores específicos; de inhibidores de las enzimas MAO y TPH, y de los transportadores SERT y VMAT. Así, por ejemplo, el agonista del autorreceptor 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT inhibe la liberación de serotonina tritiada ([³H]-5-HT) por estimulación inducida eléctricamente a partir de rodajas del rafe del mesencéfalo de ratas [19]. Así también, el tratamiento sostenido de cultivos organotípicos de rafe con citalopram, paroxetina y fluoxetina (todos ISRS) provoca un aumento en los niveles extracelulares de serotonina [22]. La depleción farmacológica de serotonina, mediante la administración de un inhibidor de la TPH, la paraclorofenilalanina (PCPA), bloquea la capacidad de los ISRS para reducir la inmovilidad en el test de suspensión por la cola utilizado en las pruebas antidepresivas en ratas o ratones [23].

2.4. Ontogenia del sistema serotoninérgico.

Desde el punto de vista embrionario, en ratas, las primeras neuronas serotoninérgicas se detectan en el día embrionario 12 (E12). Según Aitken and Tork (1988), en E14, se pueden definir tres grupos de neuronas serotoninérgicas (rostral, medial y caudal); de

éstos emergen subgrupos que continúan aumentando en número de neuronas hasta E19 [24].

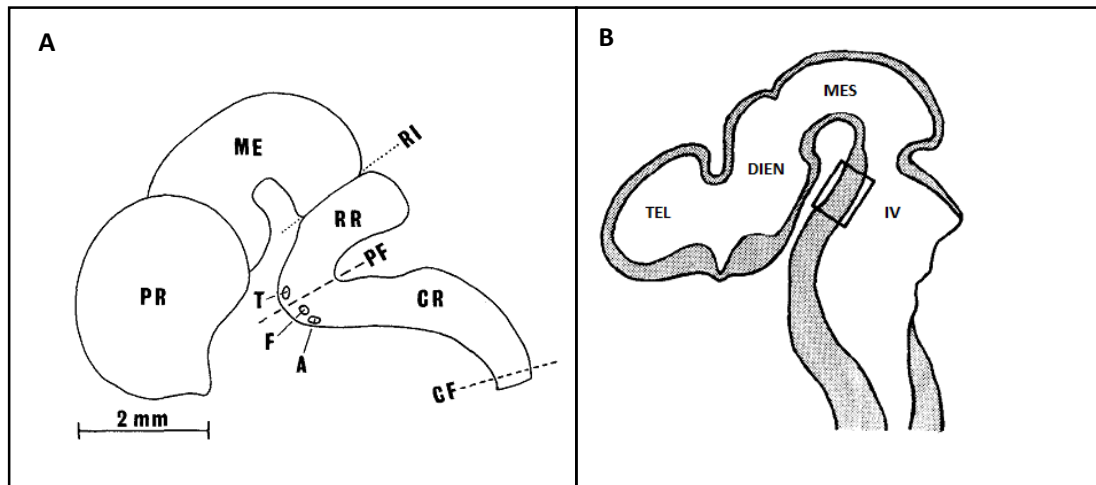


Figura 7. A) Dibujo esquemático de cerebro de embrión de rata en E14. PR, prosencéfalo; ME, mesencéfalo; T, nervio trigémino; F, nervio facial; A, nervio acústico. El romboencéfalo puede ser subdividido en una parte rostral (RR) que se extiende desde el istmo romboencefálico (RI) a la flexión pontina (PF), y en una parte caudal (CR) que se extiende desde la flexión pontina a la flexión cervical (CF). Tomado de König et al., 1988. B) Diagrama de una sección sagital de cerebro de rata en E13. El recuadro muestra la localización de las neuronas serotoninérgicas (TEL, telencéfalo; DIEN, diencefalo; MES, mesencéfalo; IV, cuarto ventrículo). Tomado de Wallace and Lauder, 1983.

Según König et al, 1988, en E14, además de los grupos dorsomediales y ventromediales en el romboencéfalo rostral que pueden observarse en E13, se detectan dos grupos más: 1) un grupo lateral redondeado situado caudalmente al punto más profundo de la flexión pontina y 2) un grupo bilateral alargado que contiene células y fibras, situado cerca de la línea media en el romboencéfalo caudal (figura 7) [25]. Según Wallace and Lauder, 1983, numerosas fibras serotoninérgicas cruzan entre los grupos de células, así como también gruesos procesos que se extienden ventralmente hacia la membrana limitante externa del embrión [26].

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

Los cultivos primarios de neuronas del SNC se han utilizado ampliamente como un modelo adecuado en el campo de la neurobiología. Proveen de un ambiente cuyo entorno puede ser controlado y que permite manipulaciones farmacológicas de células vivas que pueden ser identificadas de forma clara y precisa en cuanto a su fenotipo neuroquímico. El uso de células aisladas elimina los problemas asociados con la difusión

y acceso de las drogas que tienen los tejidos intactos. Al ser un sistema menos complejo, resulta más simple la interpretación de los resultados.

3.1. Cultivo primario de neuronas romboencefálicas.

Estudios previos han tenido un éxito variable en el establecimiento de cultivos de rafe enriquecidos en neuronas serotoninérgicas obtenidos de ratas en los estadios de E13 a E15 [27], [28], [29].

Lautenschlager et al., 2000, determinaron que las neuronas serotoninérgicas en E14 son capaces de almacenar y liberar serotonina a los dos días después de ser cultivadas. Durante 14 DIV, evidenciaron un incremento continuo en el número de somas serotoninérgicas, obteniendo en promedio 4 % de neuronas positivas para serotonina. Además, se evidenció el incremento en la formación de neuritas serotoninérgicas dando lugar a una densa red de fibras [27] .

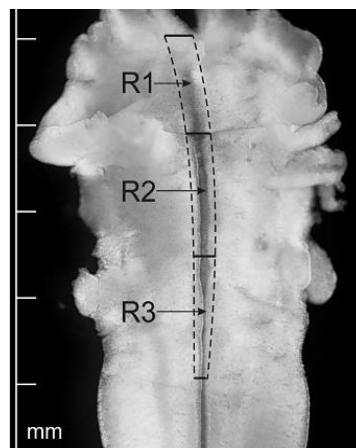


Figura 8. Romboencéfalo y parte del mesencéfalo de embrión de rata E13-14 en una vista dorsal después de la disección. R1, romboencéfalo rostral, R2, romboencéfalo medial y R3, romboencéfalo caudal. Tomado de Lautenschlager et al., 2000.

Czesak et al., 2007, caracterizaron a partir de embriones de rata en E13-E15, un cultivo primario de rafe rostral enriquecido en neuronas serotoninérgicas y obtuvieron para 7 DIV: 8% de neuronas inmunopositivas para marcadores serotoninérgicos; 5% para la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, marcador glial); 1% para tirosina hidroxilasa (TH, marcador catecolaminérgico) y 54% para GAD65/67, enzima de síntesis del ácido-gamma aminobutírico (GABA), utilizado como marcador de neuronas GABAérgicas [28].

4. Métodos de cuantificación de serotonina.

Existen diversas técnicas para cuantificar los niveles de los neurotransmisores monoaminérgicos presentes en muestras de sangre o tejido, incluyendo fluorescencia, luminiscencia química, voltametría y electroforesis capilar, a través de métodos fotométricos o de otros métodos colorimétricos que están limitados por fluorescencia y absorptividad molar bajas, respectivamente [30].

En los últimos años, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección electroquímica (ED) se ha utilizado ampliamente para el análisis de muestras biológicas. Es una técnica muy eficaz, ya que permite la separación y análisis de los componentes dentro de la matriz neuroquímica y la selectividad de la detección electroquímica ofrece ventajas en la matriz biológica compleja. La detección electroquímica ha sido ampliamente utilizada para la determinación de aminas biogénicas en muestras de sangre, tejido, líquido cefalorraquídeo y de microdiálisis [31],[30].

La técnica de HPLC permite separar mezclas moleculares, basada en la afinidad diferencial de los solutos entre dos fases inmiscibles, la fase estacionaria y la fase móvil. La detección electroquímica mide la corriente generada por un electrodo de trabajo, el cual se fija con respecto a un electrodo de referencia. Cuando se coloca el electrodo en un caudal de fase móvil, éste generará una corriente de fondo debido a la oxidación de las impurezas de la fase móvil. Si un analito electroquímicamente activo pasa por el electrodo de trabajo será oxidado (o reducido), aumentando la corriente de fondo [32]. La concentración de dicho analito en una muestra problema puede ser calculada por comparación con la corriente generada por una muestra de concentración conocida del mismo.

En relación a la cuantificación de serotonina por HPLC-ED, esta monoamina ha podido ser cuantificada en distintos tipos de muestras como líquido cefalorraquídeo, sangre o tejido, entre otros. En cultivos neurales primarios u organotípicos, son pocos los trabajos que han cuantificado los niveles endógenos de serotonina. Nagayasu et al (2010, 2013), determinaron los niveles de serotonina extracelulares de cultivos organotípicos de secciones coronales de tronco encefálico de 350 μm conteniendo el NDR y NMR, obtenidos de ratas posnatales de 2-3 días, mediante HPLC-ED luego del tratamiento agudo y crónico con citalopram, paroxetina, fluoxetina [22] y desipramina, imipramina, duloxetina y milnacipran, entre otras drogas antidepresivas [33].

Sin embargo, a pesar de que las evidencias experimentales mencionadas previamente que describen el establecimiento de cultivos primarios de neuronas serotoninérgicas con un porcentaje variable de las mismas, no se ha estudiado si dichas neuronas serotoninérgicas son capaces de liberar serotonina al medio y si es posible cuantificar dichos niveles endógenos y fisiológicos en cultivos embrionarios. El contar con esta herramienta, sería de gran utilidad para estudiar la modulación del sistema

serotoninérgico endógeno por distintas drogas como agonistas y antagonistas de los receptores de serotonina, inhibidores de las enzimas de síntesis o degradación, e inclusive la modulación por otros sistemas de neurotransmisión, como el sistema GABAérgico o de neuropéptidos como la hormona concentradora de melanina (MCH), la cual se ha evidenciado que inerva tanto el NDR como el NMR en ratas adultas.

Hipótesis.

La hipótesis de trabajo es que la utilización de un cultivo primario de neuronas romboencefálicas obtenido de embriones de rata en E14, será un preparado adecuado para el estudio *in vitro* de la fisiología de las neuronas serotoninérgicas, en especial la modulación del sistema serotoninérgico por distintos tipos de drogas que afecten su neurotransmisión.

Objetivo general.

El objetivo general de este trabajo fue caracterizar fenotípicamente un cultivo primario de romboencéfalo obtenido de rata en la etapa embrionaria E14 enriquecido en neuronas serotoninérgicas, y cuantificar los niveles de serotonina basales y en respuesta a la estimulación farmacológica.

Objetivos específicos.

1. Identificar al romboencéfalo a través de una tinción histológica y por inmunohistoquímica la localización de las neuronas serotoninérgicas en cortes sagitales y coronales de embrión de rata en estadio E14.
2. Poner a punto el establecimiento de cultivos primarios de romboencéfalo con especial énfasis en el enriquecimiento en neuronas serotoninérgicas.
3. Identificar por inmunofluorescencia en dichos cultivos primarios, neuronas; glías, y los fenotipos neuronales: serotoninérgicos, catecolaminérgicos y GABAérgicos.
4. Cuantificar los niveles intracelulares y extracelulares de serotonina en dichos cultivos por HPLC-ED en situación basal (control) y ante diversas situaciones experimentales que modifican su metabolismo (liberación, recaptación, etc.).

Metodología.

1. Cortes en parafina.

La rata hembra con una preñez de 14 días se sacrificó por decapitación y los cuernos uterinos fueron rápidamente extraídos por cesárea. Posteriormente los fetos fueron extraídos de sus sacos vitelinos mediante micro pinzas y colocados en paraformaldehído (PFA, hecho en buffer fosfato 0,1 M, pH= 7,4) al 4% durante 48 horas para su fijación. Se continuó el procedimiento con la deshidratación de los embriones en alcohol 70%, para luego continuar en alcoholes 80%, 95% y 100%, cada uno durante dos horas. Posteriormente los embriones se colocaron en un primer cloroformo durante una hora y media, y en un segundo cloroformo durante una hora. Finalmente se los colocó en una primera parafina, para luego pasarlos a una segunda parafina. Ambos pasajes se realizaron en estufa a 60 °C, durante media hora cada uno. Posteriormente se realizaron los bloques de parafina con los embriones, los cuales se cortaron en micrótopo. Los cortes tuvieron un espesor de 5 µm, que fueron levantados en láminas del tipo *superfrost* para su posterior procesamiento. Algunos embriones fueron cortados en sentido sagital y otros en sentido coronal, en referencia al Atlas of the Developing Rat Nervous System de Paxinos, G. [34] de un embrión de rata en E14.

Para determinar los cortes que correspondían a las figuras del atlas donde se identificaban los núcleos conteniendo las neuronas serotoninérgicas, se realizó la tinción de los cortes coronales con hematoxilina-eosina y de los cortes sagitales con azul de toluidina. Previamente a la tinción, los cortes debieron ser desparafinados mediante 20 minutos en estufa a 60 °C, seguidos de 20 minutos en xilol y de 2 o 3 pasajes en alcohol 100% y alcohol 95%. Posteriormente se lavaron con agua corriente y agua destilada. Para la tinción con hematoxilina-eosina, los cortes se dejaron 10 minutos en hematoxilina, seguido de dos lavados con agua corriente y agua destilada, y 3 minutos en eosina. Para la tinción con azul de toluidina luego del último lavado en agua destilada, los cortes se dejaron durante 5 minutos en dicho colorante. Finalmente, los cortes se montaron con medio de montaje histológico Histomount, luego de dos pasajes en alcohol 95%, uno en alcohol 100% y uno en xilol. Se separaron cortes coronales correspondientes a las figuras 9, 10, 11 y 14, y sagitales correspondientes a la figura 22 del Atlas of the Developing Rat Nervous System [34].

2. Cortes a congelación.

El procedimiento inicial de obtención de los embriones E14 fue el mismo que para los cortes en parafina. Los embriones se colocaron en PFA (pH= 7,4) al 4% durante toda la noche. Posteriormente se procedió a la crioprotección con sacarosa al 30% en buffer fosfato (PB) 0,1 M durante 48 horas. Finalmente se congelaron los embriones con hielo seco y fueron mantenidos a una temperatura de -80°C hasta su corte en el crióstato. Los cortes coronales y sagitales, tuvieron un espesor de $20\text{ }\mu\text{m}$, y fueron levantados en láminas del tipo *super-frost* que fueron almacenados a -20°C hasta su procesamiento para la realización de la inmunohistoquímica.

3. Inmunohistoquímica.

Para la localización de las neuronas serotoninérgicas en cortes en crióstato sagitales de embriones de rata en E14 montados en lámina, se utilizó la técnica de inmunohistoquímica en lámina y en cortes secuenciales.

Se realizaron tres lavados en PBS 0,1M cada uno de 10 minutos; posteriormente se procedió al bloqueo de las peroxidases endógenas con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 1%, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Nuevamente se realizaron tres lavados con PBS, para luego, bloquear los sitios inespecíficos con suero normal de burro (NDS) al 3% y albúmina de suero bovino (BSA) al 2%. La incubación con el anticuerpo primario (rabbit anti-serotonina 1/500, Immunostar) en PBS-TRITÓN 0,3% y NDS 3%, se realizó durante toda la noche a temperatura ambiente en cámara húmeda.

Se continuó el procedimiento con nuevos lavados con PBS 0,1M de 3, 5, 7, 7 y 10 minutos. La incubación con el anticuerpo secundario biotinilado (donkey anti-rabbit 1/600) en PBS-TRITÓN 0,3% y NDS 3%, fue de 90 minutos. Posteriormente a los lavados, se incubó con el KIT ABC (complejo avidina-biotina, 1/600, Vector Laboratories) durante 60 minutos. Luego se lavó con PBS 0,1M. El revelado se realizó incubando los cortes con H_2O_2 y diaminobencidina (DAB) durante 10 minutos. La reacción se detuvo con un lavado en agua destilada. Las neuronas serotoninérgicas se observaron con una coloración marrón debido al precipitado de DAB.

Las láminas se dejaron secar y luego se deshidrataron y montaron con Histomount.

Se observaron en un microscopio Olympus CH30 y se obtuvieron fotos en la lupa Nikon SMZ1000, con el software Micrometrics Standard Edition Premium.

4. Cultivo primario enriquecido en neuronas serotoninérgicas.

Para obtener cultivos celulares viables, todos los procedimientos se realizaron en condiciones de esterilidad. La hembra con una preñez de 14 días (se contó como día 1

el día posterior a la realización del frotis vaginal y a la verificación de la presencia de espermatozoides) fue sacrificada por decapitación y los cuernos uterinos fueron rápidamente extraídos por cesárea. Posteriormente los fetos se extrajeron de sus sacos vitelinos mediante micro pinzas y se colocaron en PBS frío. De cada embrión se disecó, bajo lupa estereoscópica y en campana de flujo laminar, la zona ventral del romboencéfalo, la cual contiene los núcleos del rafe según la metodología empleada por Lautenschlager et al., 2000 [27]. Se colectó la zona del romboencéfalo de los embriones en 1 ml de medio de cultivo compuesto por Neurobasal (Anexo 1), B-27 al 2% (Anexo 1) y L-glutamina (2mM). Las células fueron disociadas mecánicamente en 3 ml de medio, se dejó decantar la mezcla y las células en suspensión fueron traspasadas a otro tubo. El proceso se repitió dos veces para aumentar el número de células extraídas. La suspensión se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos y el pellet conteniendo las células se resuspendió en 3 a 5 ml (dependiendo del número de embriones disecados) de medio de cultivo para determinar la densidad celular en cámara de Neubauer bajo microscopio. Se utilizaron placas de cultivo de 48 o 24 pocillos (1 cm² y 1,96 cm² por pocillo, respectivamente) cubiertas con poli-L-lisina (0.1 mg/ml), compuesto sintético que promueve la adhesión y la absorción de proteínas mediante modificaciones de las cargas de superficie en el sustrato de cultivo. Se cultivaron 600.000 y 1.10⁶ células por pocillo en las placas de 48 y 24 pocillos respectivamente.

Los cultivos fueron mantenidos en estufa a 37 °C, en atmósfera de CO₂ al 5% y con saturación de agua durante 7 y 14 días.

5. Detección de los diferentes fenotipos celulares en cultivo.

5.1. Protocolo básico de inmunofluorescencia.

Luego de 7 o 14 DIV, los cultivos se fijaron con PFA al 4% y sacarosa al 5% durante 20 minutos a 37 °C. Posteriormente se lavaron con PBS, se permeabilizaron con Tritón X-100 0.1% en PBS durante 15 minutos y se realizó el bloqueo de los sitios inespecíficos con BSA al 5% en PBS durante 30 minutos. Luego se incubaron los cultivos con los correspondientes anticuerpos primarios a 4°C toda la noche y posteriormente al lavado, se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios acoplados a distintos fluoróforos durante 60 minutos. En el tercer lavado se incluyó Hoechst (1 µg/ml) para visualizar los núcleos celulares. Finalmente se lavó con PBS. Se utilizaron anticuerpos primarios específicos para identificar las neuronas (mouse anti-NeuN), neuronas serotoninérgicas (rabbit anti-5HT); GABAérgicas a través de la enzima GAD67 (mouse anti la enzima glutamato descarboxilasa, GAD); catecolaminérgicas, a través de la enzima de síntesis tirosina hidroxilasa (TH) (mouse anti-TH), y los astrocitos, a través de la detección de la proteína GFAP (mouse anti-GFAP) (tabla 1). Como control positivo

para la identificación de astrocitos mediante GFAP, se realizó la inmunofluorescencia en un cultivo de neuronas de hipocampo en E18.

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados en los ensayos de inmunofluorescencia.

Anticuerpo	Concentración	Laboratorio
Anti 5-HT (rabbit, policlonal)	1/500	Immunostar, #20080
Anti TH (mouse, monoclonal)	1/1000	Millipore, MAB318
Anti GAD 67 (mouse, monoclonal)	1/1000; 1/500; 1/250; 1/100	Millipore, MAB5406
Anti NeuN (mouse, monoclonal)	1/500	Millipore, MAB377
Anti GFAP (mouse, monoclonal)	1/400	Sigma, MS-1407

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

5.2. Protocolo modificado para la detección de NeuN por microscopía de luz.

En un grupo de experimentos NeuN fue reconocido empleando un anticuerpo secundario conjugado a un cromógeno que fue posteriormente revelado con DAB.

5.3. Protocolo modificado para la detección de neuronas GABAérgicas.

Para la detección de neuronas GABAérgicas, se realizaron tres protocolos de inmunofluorescencia:

1) Protocolo básico descrito anteriormente.

2) Permeabilización con metanol seguido del protocolo básico.

Los cultivos se incubaron con metanol durante 10 minutos a -20°C. Posteriormente se lavaron con PBS tres veces durante 5 minutos cada lavado. Previo a la incubación con el anticuerpo primario, se realizó un bloqueo con BSA de 45 minutos. Luego se procedió con el protocolo básico.

3) Permeabilización con ácido acético y etanol seguido de un nuevo protocolo.

Con el objetivo de impedir el transporte de las vesículas sinápticas que contienen GABA y GAD hacia los terminales sinápticos, causando su acumulación en el soma, y así aumentando la probabilidad de poder revelar su presencia, los cultivos de 14 días fueron tratados con colchicina 25 μ M, fármaco que inhibe la polimerización de los microtúbulos. Los tratamientos se realizaron durante 30, 60, 120 y 180 minutos.

La fijación de los cultivos se realizó con PFA al 4% y sacarosa al 5% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron con glicina 0,75% en PBS durante 10 min (2 veces), para extinguir la fluorescencia intrínseca de las células, para luego realizar dos lavados de 10 minutos con PBS. La permeabilización se realizó con ácido acético al 5% en etanol durante 20 minutos a -20°C. El bloqueo fue con BSA al 3% y suero de cabra al 10% en PBS durante 20 minutos. El anticuerpo primario GAD67 se diluyó en BSA al 3% y suero de cabra al 10% en PBS durante 60 minutos a temperatura ambiente. Luego se realizaron tres lavados con BSA 3% en PBS de 10 minutos cada uno, para continuar con la incubación del anticuerpo secundario diluido en BSA 3% y suero de cabra 10% durante 60 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron 4 lavados con PBS de 10 minutos.

5.4. Análisis de los ensayos de inmunofluorescencia.

Luego de los distintos procedimientos, se obtuvieron fotos en el microscopio de epifluorescencia, para realizar posteriormente la cuantificación de núcleos Hoechst positivos, y de las células positivas para los diferentes anticuerpos primarios ensayados. Para las cuantificaciones se evaluaron 2 pocillos por cultivo. En cada pocillo se tomaron cinco fotos de campos distintos a 40X de aumento (figura 9). El procesamiento de las imágenes se realizó en el programa Image J (figura 10).

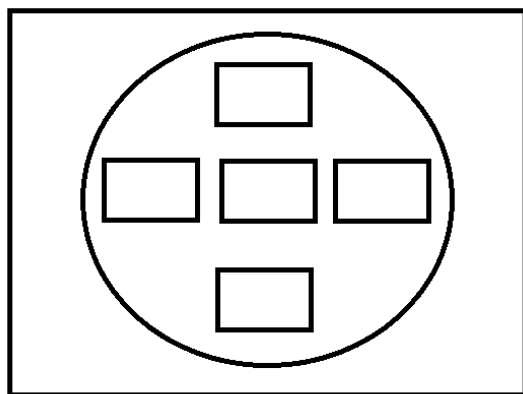


Figura 9.
Esquema de un pocillo con la localización de los 5 campos seleccionados para la cuantificación.

Primero se cuantificó el número total de células vivas en los 5 campos seleccionados de cada pocillo. El criterio utilizado para diferenciar los núcleos vivos de los muertos fue morfológico: núcleos grandes y opacos corresponden a núcleos vivos; núcleos pequeños y brillantes, a núcleos muertos. Posteriormente se cuantificó el número de neuronas inmunomarcadas en dichos campos. El porcentaje total de neuronas serotoninérgicas

en relación al total de células vivas, correspondió entonces, al promedio de esos 5 campos.

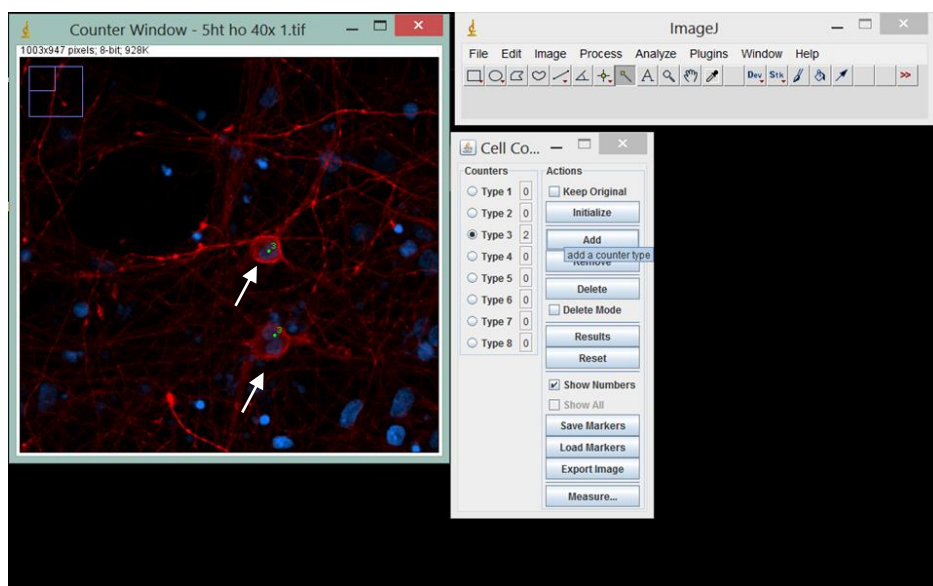


Figura 10. Foto representativa de la pantalla de trabajo del programa Image J, con una imagen de uno de los campos fotografiados en un pocillo ensayado para determinar el porcentaje de neuronas serotoninérgicas. Las flechas indican dos neuronas serotoninérgicas en dicho campo.

6. Cuantificación de los niveles de serotonina en cultivo por HPLC-ED

A los 7 y 14 DIV, se cuantificaron los niveles de serotonina en cultivo por HPLC-ED. El método se basó en el descrito por Nagayasu et al., 2010 [22], con algunas modificaciones. Dicha cuantificación se realizó en el medio extracelular (serotonina liberada por las neuronas) y en las células en cultivo propiamente dichas. Para ello, las placas se retiraron de la estufa, para posteriormente descartar el medio de cultivo y sustituirlo por buffer de Krebs- Ringer Glucosa-Hepes (KBH) (Anexo 1) a 37° C durante 15 minutos. Luego éste fue reemplazado por KBH con las distintas drogas, incubándose durante 30 minutos a 37° C [22]. Para estimular el sistema y observar un aumento en la liberación de serotonina, se utilizaron dos herramientas farmacológicas distintas: KCl y citalopram. De esta manera, se realizaron 5 tipos de tratamientos:

- 1) Control (KBH)
- 2) KCl 100 mM, 30 minutos (osmolaridad sin corregir)
- 3) KCl 50 mM en KBH modificado, 30 minutos (osmolaridad corregida)
- 4) KCl 50 mM, 5 minutos (25 minutos de KBH + 5 minutos de KCl en KBH, osmolaridad sin corregir)
- 5) Citalopram 0.1, 1, 10 y 100 µM

Para realizar el KBH modificado, el KBH 1X con una concentración de KCl 27 mM, se llevó a una concentración de KCl 50 mM y se mantuvo la osmolaridad de la solución

disminuyendo la concentración de NaCl. Por otra parte, todas las dosis de citalopram fueron diluidas en KBH 1 X.

Luego de realizados los tratamientos, las placas con las células se colocaron en hielo. Se recogió el medio de los pocillos y se le agregó ácido perclórico (PCA) para obtener una concentración final de PCA de 0.1M. Las células se levantaron por rastrillado en 200 μ l de PCA, 0,1M por pocillo. Las muestras de células fueron sonicadas y luego ambos tipos de muestras (extracto de células y medio extracelular) fueron centrifugadas durante 10 minutos a 15000 rpm y 4°C para luego colectar los sobrenadantes y pasarlos por el HPLC. Por lo tanto, para cada pocillo se obtuvieron dos tipos de muestras que fueron analizadas por separado.

Posteriormente la serotonina y su metabolito el 5-HIAA contenidos en las muestras de medio y de células fueron cuantificados por HPLC-ED. El HPLC-ED (Waters 2465) estaba equipado con una columna X-Bridge™ C-18 (partículas 3 μ m, 100 mm x 2 mm; Phenomenex Luna) que se mantuvo a 40°C. El potencial de oxidación se fijó en 0.6 V.

La fase móvil estaba compuesta por una solución de ácido cítrico (a pH = 3), que fue filtrada y desgaseada, y luego se le agregó octil sulfato de sodio (0,5 mM) y los solventes acetonitrilo (3%) y tetrahidrofurano (1,5 %) (Anexo 1).

El volumen de inyección de las distintas muestras fue de 100 μ l y el flujo de la fase móvil de 0,3 mL/min, con un tiempo total de análisis de 10-12 minutos por muestra.

Para determinar las concentraciones de serotonina y 5-HIAA se comparó la señal obtenida en las muestras con la de una solución estándar (Anexo 1) de ambos compuestos con concentración conocida (5pg/ μ l).

7. Análisis de datos:

Los datos fueron expresados como la media $\pm$ desvío estándar (DE).

Se calculó el porcentaje de células serotoninérgicas en relación al número de células viables en los campos seleccionados.

Para los efectos de los tratamientos en los niveles de serotonina intra y extracelulares, se realizaron triplicados en cada experimento, se promediaron sus valores y se expresaron como cambios en relación a los valores controles de cada experimento. Las diferencias significativas se determinaron usando el t-test pareado o el test de ANOVA de una vía seguido del test *post*-Tukey, según lo requerían los datos.

Resultados.

1. Localización de los núcleos del rafe en embrión de rata E14.

Tanto de los cortes coronales como sagitales pudieron obtenerse imágenes similares a las correspondientes figuras 22 y 14 del Atlas of the Developing of Nervous System [34], respectivamente. Los núcleos del rafe en el embrión E14 se localizan en el romboencéfalo, que forma parte del metencéfalo (figura 11).

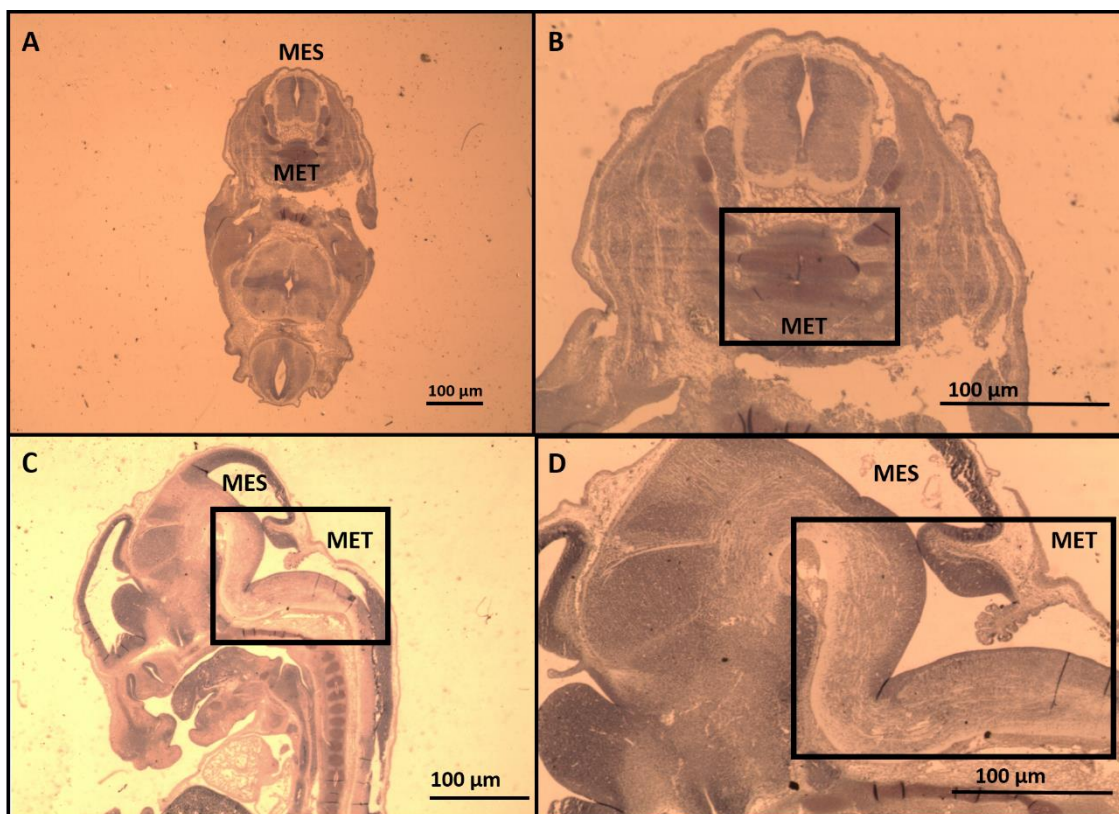


Figura 11. Localización del metencéfalo en cortes coronales y sagitales de embrión de rata en E14. A) Corte coronal de rata E14 a nivel de la figura 14 del Atlas of the Developing Rat Nervous System. B) Detalle de la figura A. En el recuadro se indica el metencéfalo. C) Corte sagital de rata E14, a nivel de la figura 22 del Atlas of the Developing Rat Nervous System. El recuadro indica la zona mostrada en D. D) Detalle de la figura C. MET: metencéfalo, MES: mesencéfalo. Barra de calibración de 100 µm.

2. Localización de las neuronas serotoninérgicas en embrión de rata E14.

Las neuronas serotoninérgicas en el embrión de rata en E14 presentaron una localización en tres subgrupos celulares situados en el romboencéfalo; un grupo localizado en el romboencéfalo rostral, otro en el romboencéfalo medial y un tercero en el romboencéfalo caudal. Dichas neuronas presentaron una forma redondeada y con pocas neuritas, de aspecto inmaduro. Además pudieron observarse fibras que se extienden ventralmente (Figura 12).

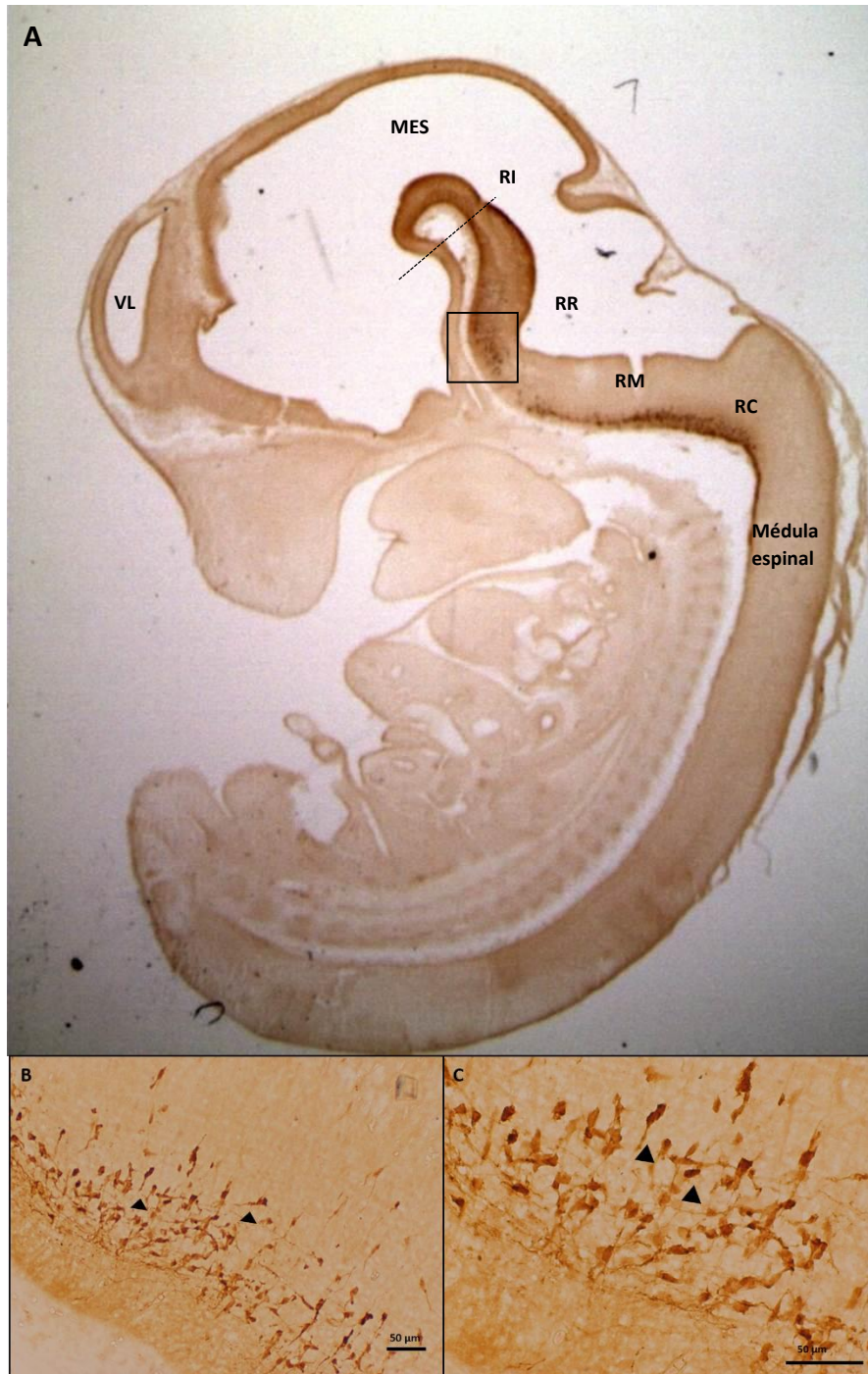


Figura 12. A) Inmunohistoquímica para la detección de serotonina de un corte sagital de 30 µm de un embrión de rata en E14, a nivel de la figura 22 del Atlas of the Developing Rat Nervous System [34]. El recuadro indica el área mostrada en B. B) Detalle de neuronas serotoninérgicas a mayor aumento. C) Neuronas serotoninérgicas a mayor aumento. Puntas De flecha: somas de las neuronas serotoninérgicas VL, ventrículo lateral; MES, mesencéfalo; RI, istmo romboencefálico; RR, romboencéfalo rostral; RM, romboencéfalo medial; RC, romboencéfalo caudal. Barra de calibración de 50 µm.

3. Cultivos 7 DIV.

3.1. Cuantificación de las neuronas serotoninérgicas.

La cuantificación de tres cultivos de 7 DIV mostró un promedio de $1,33 \pm 0,55 \%$ ($n=3$) de neuronas inmunopositivas para serotonina en relación al total de células vivas en cultivo. Se consideraron núcleos de células viables a los núcleos grandes y opacos,

mientras que los pequeños y brillantes, fueron considerados como núcleos de células no viables (figura 13), como fue descrito en la metodología en cultivo. Las neuronas serotoninérgicas presentaron una forma estrellada con muy pocas neuritas y un tamaño de entre 30 y 35 μm (figura 14).

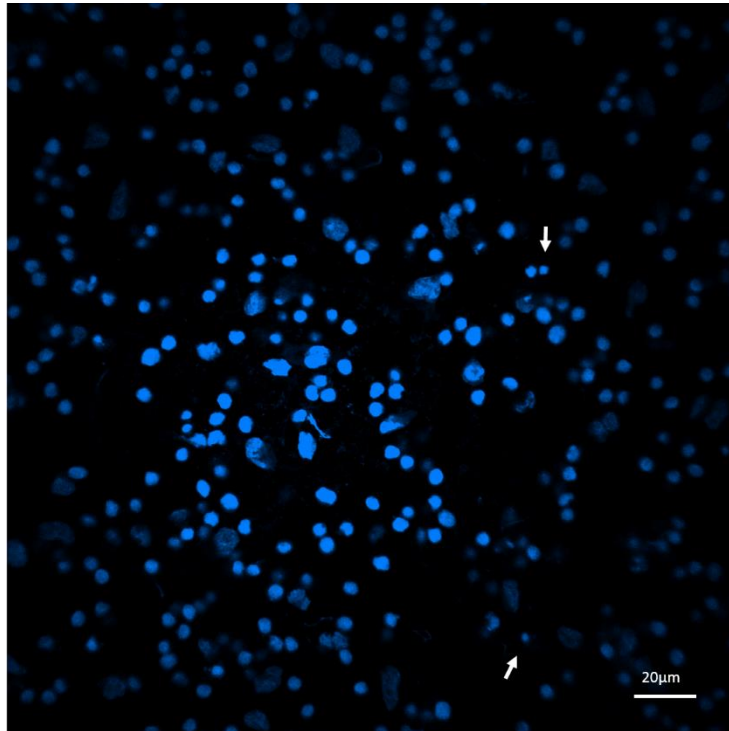


Figura 13. Foto representativa de uno de los 5 campos fotografiados por pocillo de un cultivo de 7 DIV. Se observan los núcleos marcados con hoechst, las flechas indican los núcleos de células muertas (picnóticas). Barra de calibración de 20 μm .

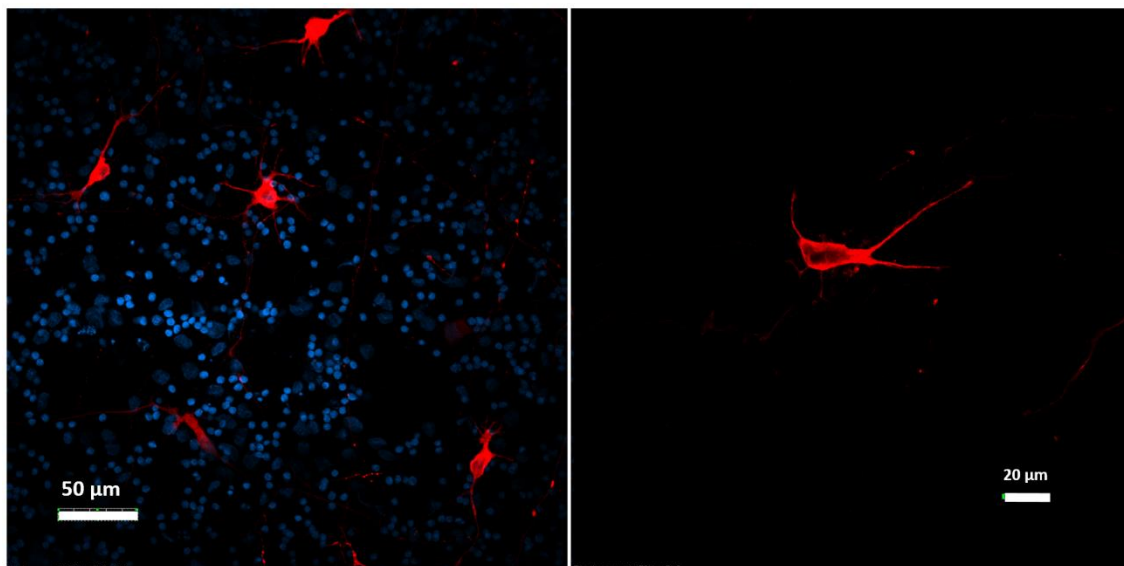


Figura 14. Fotos representativas de los ensayos de inmunofluorescencia para detectar neuronas serotoninérgicas. A) Neuronas serotoninérgicas de 7 DIV, barra de calibración de 50 μm . B) Foto a mayor aumento de una neurona serotoninérgica de 7 DIV, barra de calibración de 20 μm .

3.2. Detección de otros fenotipos neuronales.

No fueron detectadas neuronas inmunopositivas para TH, ni para GFAP. Para evidenciar la presencia de neuronas GABAérgicas a los 7 DIV se utilizó el protocolo de inmunofluorescencia básico descrito en materiales y métodos. Pudo ser puesta en evidencia la presencia de un escaso número de neuronas GABAérgicas (figura 15 A). La marca de algunas de dichas neuronas se observó co-localizando con la marca para serotonina (figura 15 C). De todos modos, no logramos obtener marcas confiables de neuronas GABAérgicas para lograr basarnos en ella para cuantificar su número en los cultivos.

Utilizando el protocolo de inmunofluorescencia básico descrito en materiales y métodos para identificar NeuN, no se obtuvieron imágenes confiables: la marca de la inmunofluorescencia anti-NeuN (proteína nuclear), fue más citoplasmática que nuclear, por lo que no se pudo cuantificar el número de neuronas.

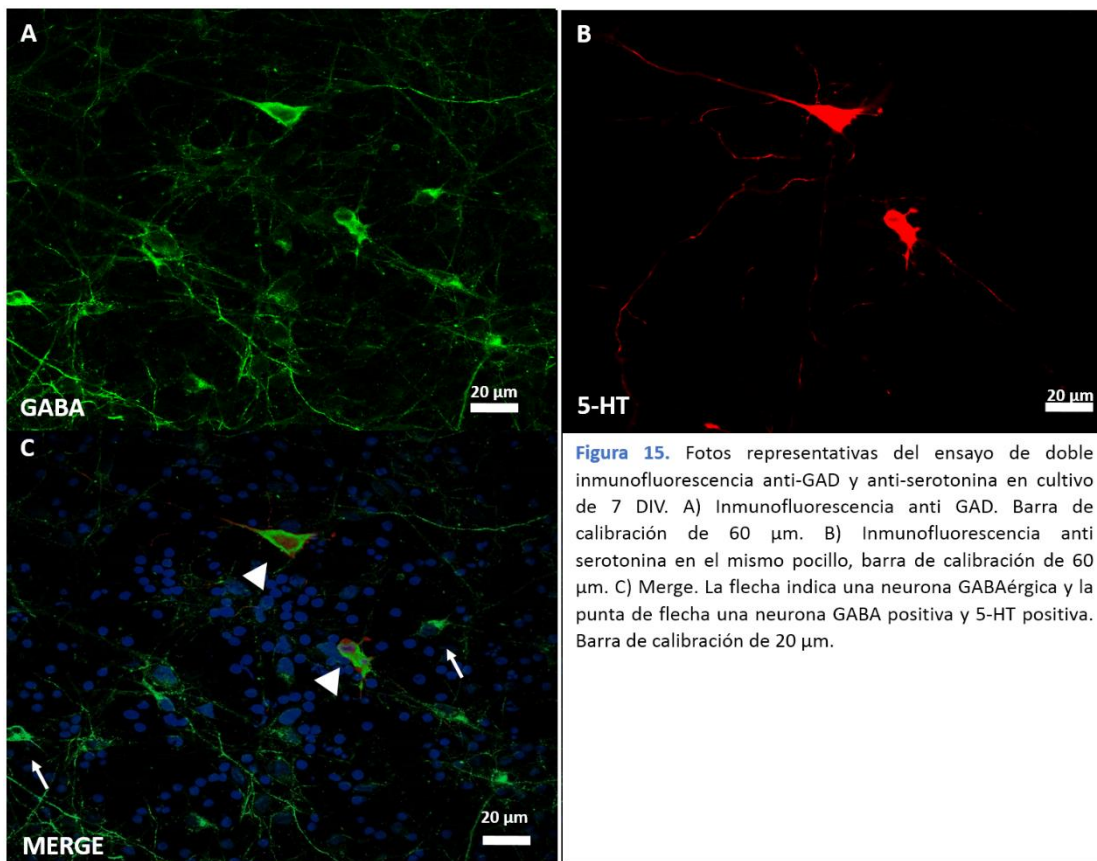


Figura 15. Fotos representativas del ensayo de doble inmunofluorescencia anti-GAD y anti-serotonina en cultivo de 7 DIV. A) Inmunofluorescencia anti GAD. Barra de calibración de 60 µm. B) Inmunofluorescencia anti serotonina en el mismo pocillo, barra de calibración de 60 µm. C) Merge. La flecha indica una neurona GABAérgica y la punta de flecha una neurona GABA positiva y 5-HT positiva. Barra de calibración de 20 µm.

3.3. Cuantificación de los niveles de serotonina por HPLC-ED.

A pesar de haber evidenciado la presencia de neuronas serotoninérgicas en los cultivos de 7 DIV, los niveles de serotonina intracelulares y extracelulares en condiciones basales no pudieron ser cuantificados por encontrarse debajo del límite de detección del sistema de HPLC-ED utilizado. Sí pudieron cuantificarse los niveles de serotonina luego del tratamiento con citalopram 10 μ M y KCl 100 mM. La concentración de serotonina luego de ambos tratamientos fue aproximadamente la misma (tabla 2) En estos experimentos no se cuantificaron los niveles de 5-HIAA.

Tabla 2. Concentración de serotonina en ng/ μ l en el medio luego del tratamiento con KCl 100 Mm y citalopram 10 μ M. ND: no detectable. Los datos son expresados como la media $\pm$ DE (n=2).

Tratamiento	ng/ μ l de 5-HT
KBH	ND
KCl 100 mM	0.0013 $\pm$ 0.0004
Citalopram 10 μ M	0.0011 $\pm$ 0.0002

4. Cultivos 14 DIV.

4.1. Cuantificación de las neuronas serotoninérgicas y otros fenotipos neuronales.

La cuantificación de ocho cultivos de 14 DIV mostró un promedio de $1,91 \pm 0,76\%$ (n= 8) de neuronas inmunopositivas para serotonina en relación al total de células vivas en cultivo. Las neuronas serotoninérgicas presentaron una forma redondeada con abundantes prolongaciones (figura 16) y un tamaño de entre 35 y 40 μ m (figura 14 B-D).

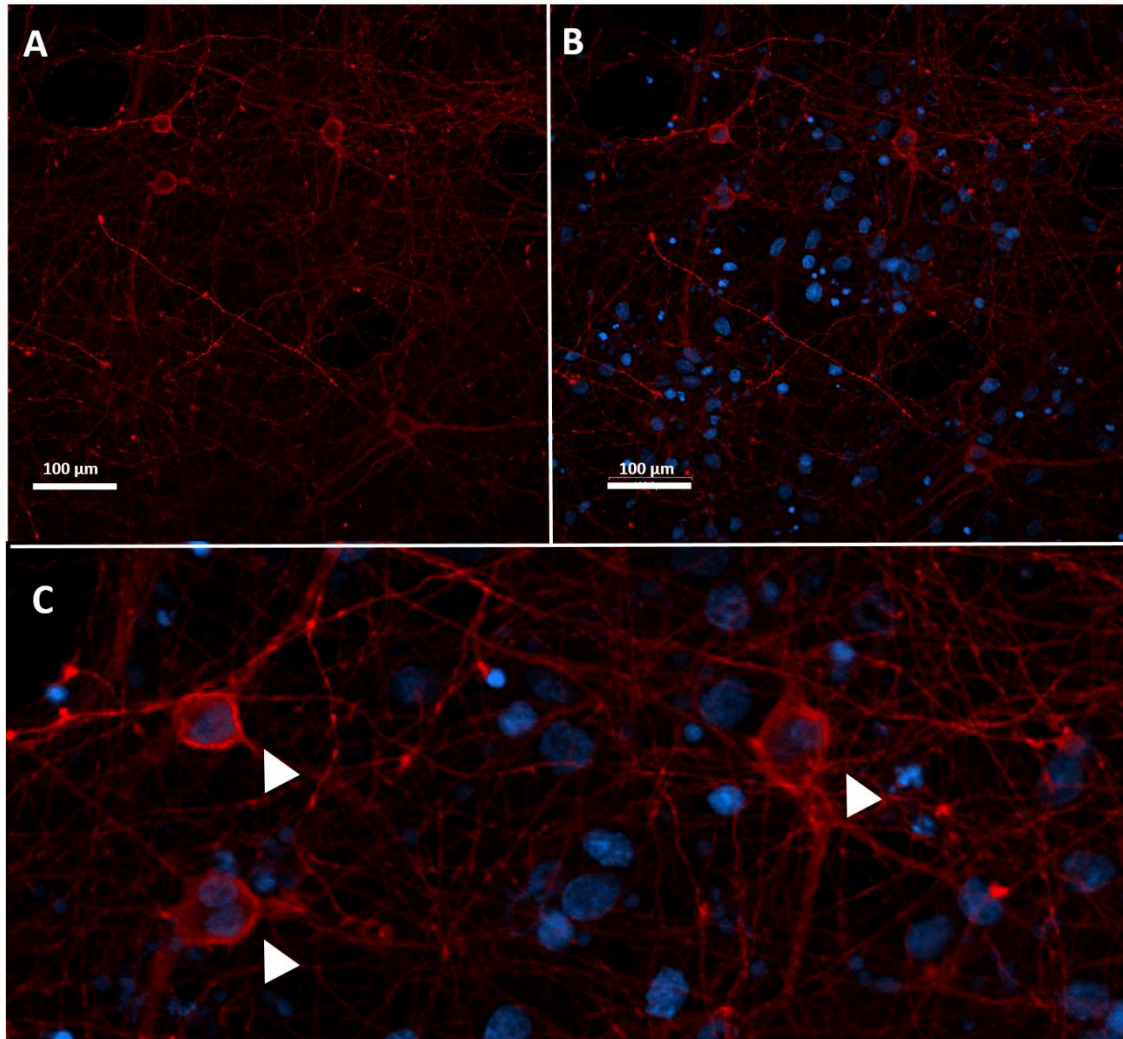


Figura 16. Fotos representativas de neuronas serotoninérgicas en cultivos de 14 DIV. A) Células 5-HT positivas (rojo). B) Células 5-HT positivas (rojo) y núcleos marcados con hoechst (azul). C) Neuronas serotoninérgicas a mayor aumento y sus núcleos (puntas de flechas). Barra de calibración de 100 µm.

4.2. Detección de otros fenotipos neuronales.

Al igual que en los cultivos de 7 DIV, no fueron detectadas neuronas inmunopositivas para TH, ni para GFAP, descartando la presencia de astrocitos. Asimismo, para tratar de mejorar la marca obtenida para las neuronas GABAérgicas en los cultivos de 7 DIV, se probaron diferentes protocolos experimentales. El protocolo que mostró mejores resultados, fue el que se realizó con un pre-tratamiento durante tres horas con colchicina (figura 17 A). Al igual que en los cultivos de 7 DIV, la marca de algunas de dichas neuronas se observó co-localizando con la marca para serotonina (figura 17 C). De todos modos, tampoco pudimos obtener marcas confiables para cuantificar su número en los cultivos. La inmunofluorescencia anti-NeuN mostró una marca citoplasmática y poco definida que no corresponde con la presencia nuclear de este antígeno.

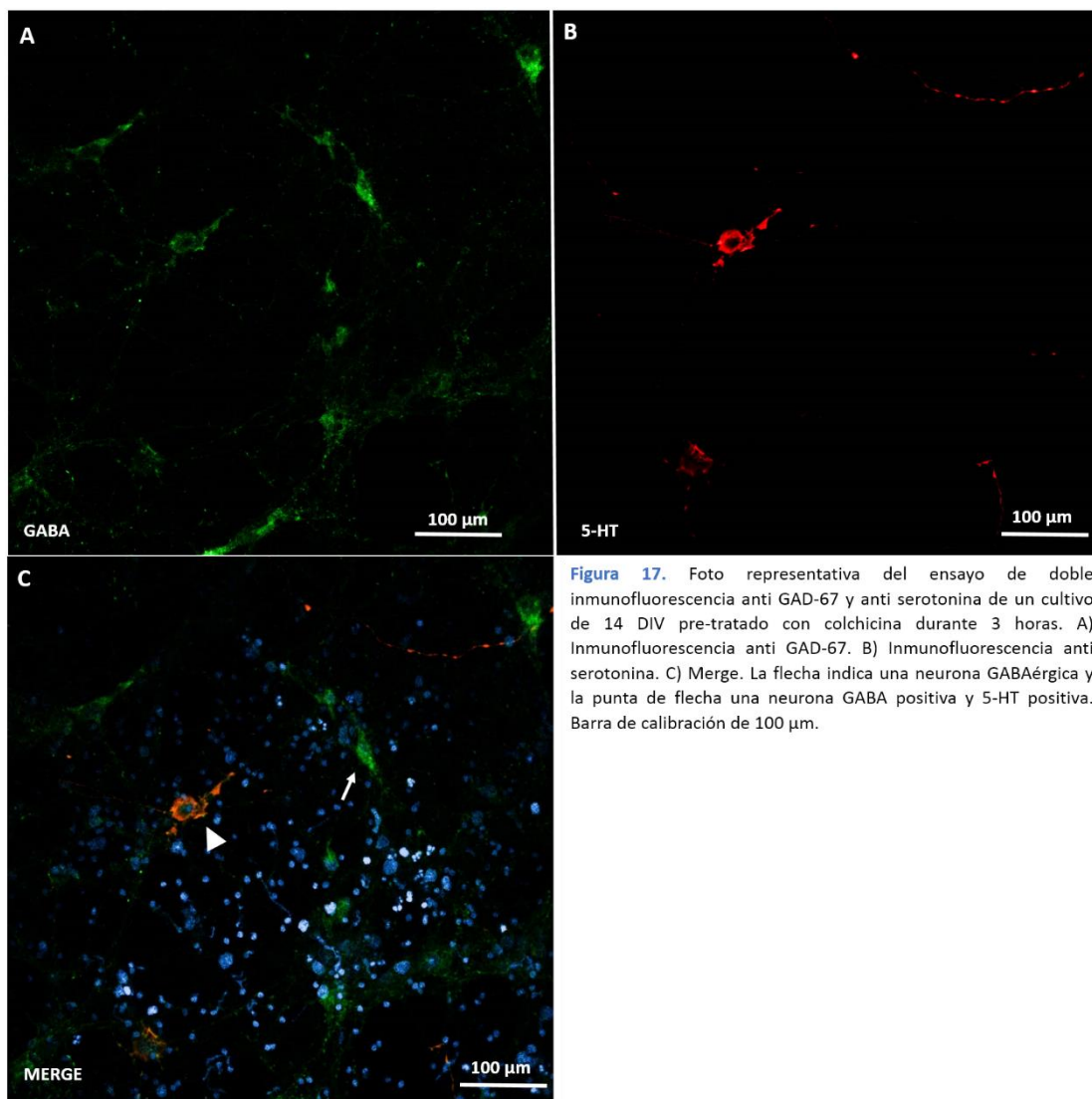


Figura 17. Foto representativa del ensayo de doble inmunofluorescencia anti GAD-67 y anti serotonina de un cultivo de 14 DIV pre-tratado con colchicina durante 3 horas. A) Inmunofluorescencia anti GAD-67. B) Inmunofluorescencia anti serotonina. C) Merge. La flecha indica una neurona GABAérgica y la punta de flecha una neurona GABA positiva y 5-HT positiva. Barra de calibración de 100 μm.

4.3. Cuantificación de los niveles basales de serotonina por HPLC-ED.

A diferencia de lo observado en los cultivos de 7 DIV, los niveles de serotonina basales a los 14 DIV fueron cuantificables. La figura 18 muestra dos cromatogramas representativos; uno obtenido luego de inyectar 50 μl de solución estándar conteniendo el ácido 3,4-Dihidroxifenilacético (DOPAC), DOPAMINA, 5-HIAA, ácido homovanílico (HVA) y serotonina en el HPLC, y otro obtenido luego de inyectar 100 μl de una muestra control de medio. Se puede observar que la serotonina eluye entre los minutos 9 y 10 de comenzada la corrida, mientras que el 5-HIAA entre los minutos 5 y 5'30".

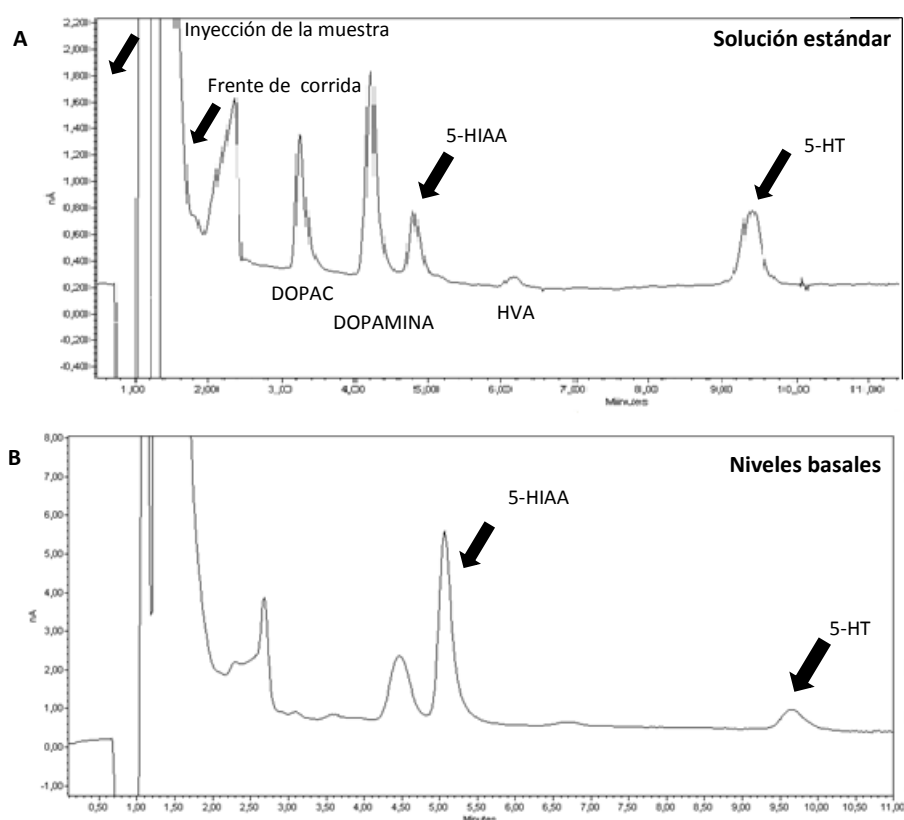


Figura 18. Cromatogramas representativos. A) Solución estándar conteniendo concentraciones conocidas de DOPAC, DOPAMINA, 5-HIAA, HVA y 5-HT. B) Muestras de medio con niveles basales de 5-HT y 5-HIAA. Unidades: nA vs tiempo de corrida (minutos).

Los niveles basales de serotonina en el medio alcanzaron en promedio una concentración de 0.03 ± 0.02 ng/ μ l, mientras que en las células los niveles basales alcanzaron un valor de 0.69 ± 0.39 ng/ μ l de serotonina. Esto muestra que la serotonina contenida en las neuronas alcanzó niveles 23 veces mayores a los niveles de la serotonina liberada al medio en condiciones basales. Por otra parte, la concentración de 5-HIAA basal en el medio alcanzó un valor de 0.85 ± 0.31 ng/ μ l y en las células de 0.13 ± 0.04 ng/ μ l, lo que corresponde a una cantidad de 8 veces más de metabolito en el medio extracelular que dentro de las células (tabla 3).

Los niveles de 5-HIAA basales en el medio fueron 28 veces superiores a los correspondientes niveles de serotonina (0.85 ± 0.31 ng/ μ l 5-HIAA vs. 0.03 ± 0.02 ng/ μ l serotonina). En cambio, a nivel de las células, la serotonina presentó una concentración 7 veces mayor que la de 5-HIAA (tabla 3).

Tabla 3. Niveles basales de 5-HT y 5-HIAA cuantificados en ng/ μ l, en relación a la solución estándar, y el cociente entre 5-HIAA y 5-HT. Los datos son expresados como la media $\pm$ DE (n=3).

	Medio (ng/ μ l)	Células (ng/ μ l)
5-HT	0.03 $\pm$ 0.02	0.69 $\pm$ 0.39
5-HIAA	0.85 $\pm$ 0.31	0.13 $\pm$ 0.04
5-HIAA/5-HT	28.33 $\pm$ 15.5	0.188 $\pm$ 0.10

4.4. Cuantificación de los niveles de serotonina y 5-HIAA luego del tratamiento con KCl.

Los niveles de serotonina luego del tratamiento con KCl 50 mM durante 5 y 30 minutos en KBH, aumentaron aproximadamente 2,5 veces con respecto al control en el medio (figura 19 A y C). En cambio, los niveles de 5-HIAA no presentaron cambios significativos (figura 19 B y D).

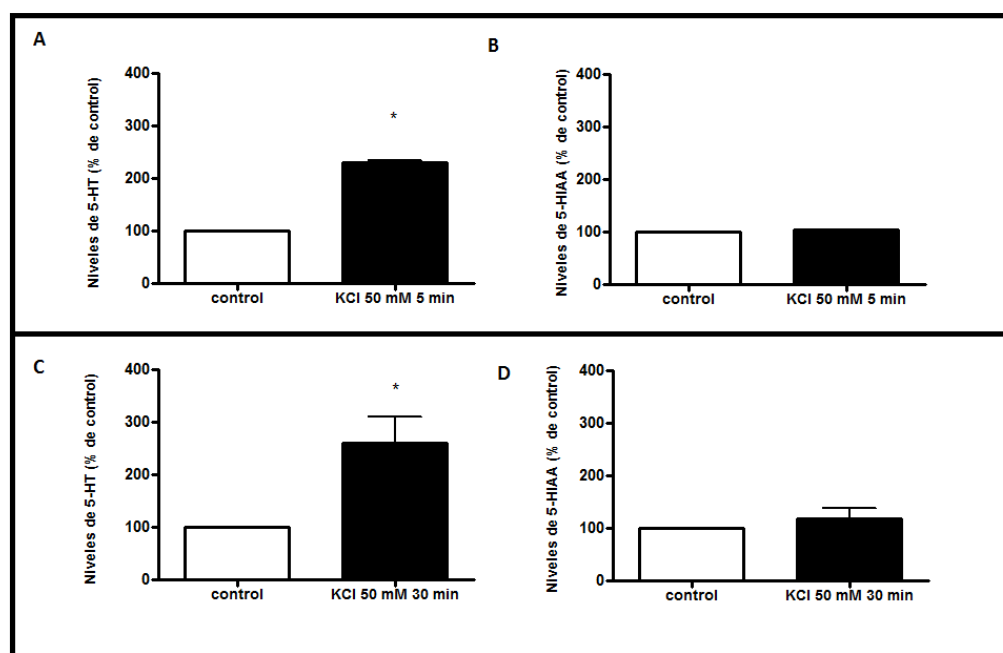


Figura 19. Niveles de serotonina y 5-HIAA en el medio luego del tratamiento con KCl 50 mM durante 30 minutos y 5 minutos. A) Niveles de 5-HT luego del tratamiento con KCL 50 mM, 30 min (n=3). B) Niveles De 5-HIAA luego del tratamiento con KCL 50 mM, 30 min(n=3). C) Niveles de 5-HT luego del tratamiento con KCL 50 mM, 5 min (n=2). D) Niveles de 5-HIAA luego del tratamiento con KCl 50 mM, 5 min (n=2). * p < 0,05, t-test pareado.

4.5. Cuantificación de los niveles de serotonina y 5-HIAA luego del tratamiento con citalopram.

Los niveles de serotonina en el medio luego del tratamiento agudo (30 minutos) con citalopram 1 y 10 μM , mostraron un aumento significativo con respecto a los niveles basales. La dosis de 1 μM fue la que mostró el mayor aumento, en cambio las dosis de 0.1 y 100 μM no mostraron un aumento significativo con respecto al control. La concentración basal promedio de serotonina en el medio presentó un valor de 0.03 ± 0.02 ng/ μl , mientras que luego del tratamiento con citalopram 1 μM fue de 0.24 ± 0.03 ng/ μl y con 10 μM de 0.20 ± 0.06 ng/ μl . Esto es, por tanto, un aumento de aproximadamente 8 veces en la concentración de serotonina en el medio para

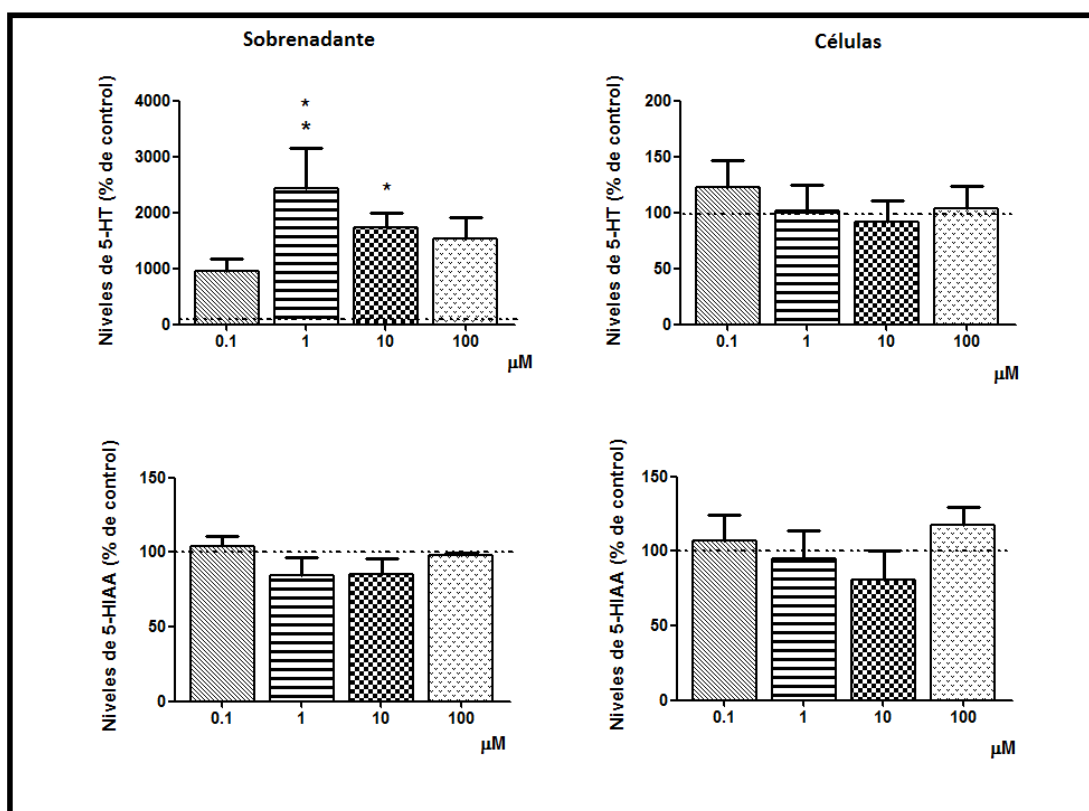


Figura 20. Curva dosis-respuesta de Citalopram. Niveles de 5-HT (A) y 5-HIAA (C) en el medio en respuesta al pre-tratamiento con las diferentes concentraciones de citalopram. Niveles celulares de 5-HT (B) y 5-HIAA (D) en respuesta al citalopram. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ ($n=3$), test ANOVA de una vía seguido de test post- Tukey.

citalopram 1 μM y de 6.5 veces para la dosis de 10 μM comparado con los niveles basales. Los niveles de 5-HIAA en el medio no aumentaron significativamente con respecto al control ante las diferentes concentraciones de citalopram, como tampoco los niveles de serotonina y 5-HIAA a nivel de las células en todas las concentraciones ensayadas (Figura 20).

Al observar en detalle los cambios producidos en los niveles de serotonina y 5-HIAA en el medio y en el interior celular, en respuesta a la dosis de citalopram que presentó el mayor aumento significativo en los niveles de serotonina en el medio (1 μ m), puede verse que luego del tratamiento con dicha dosis los niveles de 5-HIAA en el medio fueron

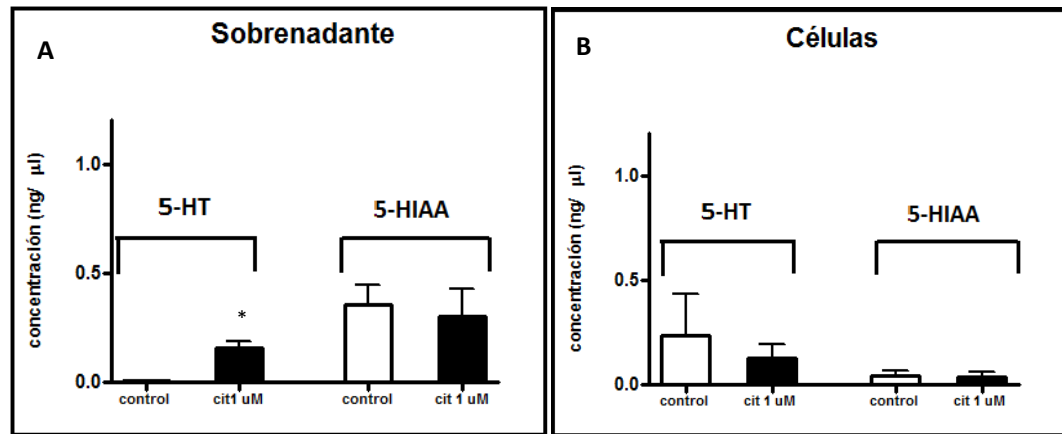


Figura 21. A) Niveles basales y luego del tratamiento con citalopram 1 μ M de serotonina y 5-HIAA en el medio extracelular y el interior celular. * $p < 0,05$ ($n=3$), t-test pareado.

de aproximadamente el doble que los niveles de serotonina ($0,24 \pm 0,03$; $0,43 \pm 0,31$) en el medio. Si este resultado se compara con el obtenido en condiciones basales, puede observarse que de tener 28 veces más 5-HIAA que serotonina se pasó a tener solamente 2 veces más de 5-HIAA que serotonina en el medio luego del tratamiento con citalopram (figura 21 A). Asimismo, se observó una disminución en los niveles de 5-HIAA a nivel de las muestras de células ($0,13 \pm 0,04$ vs $0,06 \pm 0,02$), que estaba 5 veces menos concentrada que en condiciones basales (figura 21 B).

Discusión.

1. Caracterización del cultivo primario de romboencéfalo.

Los resultados obtenidos indicaron que los cultivos primarios de romboencéfalo de embriones de rata en E14 de 7 y 14 DIV presentaron células viables, y que, sin embargo se obtuvo un porcentaje de células serotoninérgicas inferior al reportado previamente. Mientras que Czesak et al., 2007, obtuvieron un 8% de neuronas inmunopositivas para marcadores serotoninérgicos a 7 DIV [28] y Lautenschlager et al., 2000, un 4% a 14 DIV [27], en nuestros cultivos obtuvimos 1,3% y 1,9%, a 7 y 14 DIV, respectivamente. A diferencia de evidencias previas [28], en nuestros cultivos no obtuvimos neuronas TH positivas ni astrocitos, y a pesar de realizar diversos protocolos con distintos pre-

tratamientos y distintos tipos de fijación, no pudimos poner en evidencia la presencia del gran número de neuronas GABAérgicas reportado por otros autores.

En relación al menor porcentaje de neuronas serotoninérgicas obtenidas, podemos sugerir como causas principales, la precisión en la disección del romboencéfalo, diferencias en el tiempo de manipulación de los embriones durante la disección y en las condiciones de cultivo. A pesar de que el porcentaje de neuronas TH positivas reportado por Czesak et al., 2007, fue del 1%, la ausencia de estas neuronas en nuestros cultivos también podría deberse a la precisión de la disección [28]. La ausencia de astrocitos en cultivos neuronales ha sido reportado previamente por Brewer et al., 1993, quienes establecieron que la proliferación glial es suprimida bajo condiciones de cultivo en un medio libre de suero y con medio B27/Neurobasal, condiciones bajo las cuales se realizaron nuestros cultivos.

Al comparar los cultivos de 7 y 14 DIV, no existieron diferencias significativas en el número de neuronas 5-HT positivas, pero sí pudieron observarse diferencias morfológicas en el estado de madurez de las mismas: las neuronas serotoninérgicas de 14 DIV presentaron una cantidad mayor de neuritas (más arborizadas) que las neuronas de 7 DIV. Dicha diferencia en la madurez de los cultivos entre los 7 y 14 DIV podría estar directamente relacionada a los niveles basales de serotonina contenidos en las neuronas y que fueron liberados al medio y pudieron ser cuantificados por nuestro método de detección.

2. Cuantificación de niveles basales de serotonina.

A los 7 días de cultivadas las neuronas, los niveles basales de serotonina no fueron detectables por HPLC-ED. Sin embargo, a los 14 DIV se lograron detectar y cuantificar niveles basales de serotonina tanto en las células como en el medio extracelular, así como también se cuantificaron los niveles basales de su principal metabolito, el 5HIAA. Como ya se mencionó anteriormente, existe una diferencia importante en la madurez de las neuronas serotoninérgicas en los cultivos de 7 y 14 DIV y ésta podría estar relacionada a la sensibilidad del equipo para detectar y cuantificar pequeñas concentraciones de serotonina y 5-HIAA en este tipo de muestras.

La presencia de niveles cuantificables de serotonina y 5-HIAA basales extracelulares mostró el correcto funcionamiento de las neuronas serotoninérgicas cultivadas. Estos resultados sugieren que en estas condiciones las neuronas serotoninérgicas liberan serotonina al medio que será recaptada por los transportadores SERT localizados en su membrana celular. Dentro del interior celular, la serotonina que no es almacenada nuevamente en vesículas, será degradada por las enzimas MAO A y ALDH, y se producirá el metabolito 5-HIAA, el cual será liberado al medio por difusión simple [3]. Por tanto, en el medio estarán presentes tanto la serotonina como su metabolito, y en proporciones distintas. En estas condiciones basales, la concentración de 5-HIAA en el medio fue 28 veces mayor a la concentración de serotonina. Dicha diferencia puede ser

debida a la acción de los transportadores SERT, que rápidamente recaptan la serotonina y la devuelven al interior celular para ser nuevamente vesiculizada o degradada [36]. Así también, de acuerdo a lo que está descrito para el sistema serotoninérgico en nuestros cultivos, la concentración de serotonina fue aproximadamente 7 veces mayor que la de 5-HIAA en las muestras de células.

Es interesante resaltar que, a pesar de la baja proporción de neuronas serotoninérgicas (1,33% para 7 DIV (n=3) y 1,91% para 14 DIV (n=8)) en relación al total de células vivas contabilizadas en nuestros cultivos ($n=3227,3 \pm 858,3$ (7 DIV); $n=1159,6 \pm 477,9$ (14 DIV)), estas neuronas crecieron en un ambiente óptimo para el funcionamiento de su maquinaria biosintética, de liberación y degradación, lo cual fue puesto en evidencia en la cuantificación de los niveles de serotonina y 5-HIAA tanto en las muestras de células como de medio. Por otra parte, y en la misma línea de análisis, a pesar de las pocas neuronas serotoninérgicas por pocillo obtenidas, se pudieron cuantificar niveles de serotonina a través de nuestro sistema de detección, lo cual lo convierte en una herramienta óptima para estudiar la modulación de este sistema en cultivo.

3. Estimulación farmacológica del sistema serotoninérgico.

Existe una amplia evidencia que demuestra que la administración sostenida de ISRS aumenta la liberación de serotonina, preferencialmente en los núcleos del rafe. Por ejemplo, a través de un estudio de microdiálisis *in vivo*, se determinó que la fluvoxamina administrada sistémicamente incrementa la serotonina extracelular en los núcleos del rafe [37]; la administración sistémica aguda de fluoxetina aumentó los niveles extracelulares de serotonina en la corteza frontal, hipocampo ventral y los núcleos del rafe cuantificada por microdiálisis *in vivo* en ratas anestesiadas [38]. A diferencia de trabajos previos realizados en cultivos organotípicos de rafe de ratas postnatales (P2-3)[22], en los que se obtuvo un aumento significativo en los niveles de serotonina en el medio solamente luego de la exposición crónica sostenida con citalopram (durante 4 días), nuestros resultados muestran que los niveles de serotonina aumentaron de forma significativa luego del tratamiento agudo con dicha droga. Los autores realizaron tratamientos agudos, pero no observaron diferencias significativas en los niveles de serotonina. Es posible que la razón de esta diferencia se deba a las características propias de cada tipo de cultivo; mientras que los niveles de serotonina cuantificados a partir de cultivos organotípicos se obtienen de una sección de tejido de 350 μm , los cultivos primarios se cuantifican a partir de una sola capa de células. Así, las drogas presentarán diferente accesibilidad a sus respectivos blancos de acción. Por otra parte, en la rodaja de 350 μm , se mantienen muchas de las conexiones entre las neuronas serotoninérgicas y de ellas con el resto de las neuronas de dicho núcleo, lo cual podría estar regulando a la baja la liberación de serotonina o su mantenimiento en el medio de dichas rodajas. Nuestros cultivos, al ser cultivos en monocapa no presentan la complejidad de las conexiones de un cultivo organotípico, y por tanto, las diferencias en los resultados obtenidos también podrían dar cuenta de dicha diferencia.

Los resultados mostraron que luego del tratamiento con citalopram $1\mu\text{M}$ (figura 21) los niveles de 5-HIAA en el medio fueron de aproximadamente el doble que los niveles de serotonina ($0,24 \pm 0,03$ (serotonina) vs $0,43 \pm 0,31$ (5-HIAA) en el medio, y que de tener 28 veces más 5-HIAA que serotonina se pasó a tener solamente 2 veces más de 5-HIAA que serotonina en el medio luego del tratamiento con citalopram (figura 21 A). Este resultado nos estaría sugiriendo que al estar bloqueados los transportadores SERT por la acción del citalopram, se impide que la serotonina sea recaptada por la célula y por consiguiente sea degradada por la enzima MAO y metabolizada a 5-HIAA. Por lo tanto, la disminución de los niveles de 5-HIAA en el medio es comparable con este dato.

La curva dosis respuesta del efecto del citalopram sobre la concentración de serotonina cuantificada en nuestros cultivos tuvo un perfil de tipo campana, y el máximo efecto se observó a la concentración de $1\mu\text{M}$. Las posibles explicaciones a dicho resultado incluyen la autorregulación de las neuronas serotoninérgicas por la activación de los autorreceptores 5-HT₁ (que inhiben su liberación) o efectos no específicos de las concentraciones más altas de citalopram ($100\mu\text{M}$) [22].

Conclusiones.

Nuestros resultados muestran que obtuvimos cultivos primarios de romboencéfalo de rata en E14 enriquecidos en un 1,91% de neuronas serotoninérgicas a los 14 DIV, que no presentaron neuronas TH positivas ni astrocitos. Hemos encontrado dificultades en lograr una caracterización fenotípica más completa de dichos cultivos, fundamentalmente en cuanto a la determinación de las neuronas GABAérgicas, la segunda población en número presente en el NDR (luego de la serotoninérgica). Sin embargo, pensamos que con la utilización de diferentes tipos de anticuerpos anti-GABA o anti GAD-65, se podrán cuantificar las neuronas GABAérgicas.

Nuestros resultados muestran que el cultivo primario de romboencéfalo de rata en E14, enriquecido en neuronas serotoninérgicas, se encuentra funcionalmente activo y que responde de forma óptima a la estimulación farmacológica, y en particular a la estimulación farmacológica de una droga específica del sistema serotoninérgico (citalopram) que promueve el aumento de los niveles de serotonina extracelulares. Además, dichos niveles, y los de su principal metabolito, pudieron ser cuantificados por HPLC-ED.

Por tanto, dicho sistema parece ser una herramienta experimental apropiada para el estudio y modulación del sistema serotoninérgico.

Perspectivas.

- Completar la caracterización fenotípica, fundamentalmente determinar el número de neuronas y la presencia de neuronas GABAérgicas, así como su cuantificación.
- Analizar la presencia del transportador SERT y de los autorreceptores 5-HT1 A/D.
- Utilizar otros ISRS, como la fluoxetina, que ha sido recientemente descrito no sólo como un inhibidor de la recaptación de la serotonina, sino también como un liberador de serotonina desde las dendritas o los terminales nerviosos [19].
- Utilizar otras drogas con acciones farmacológicas distintas a los ISRS, como un inhibidor no selectivo de la recaptación de serotonina (nortriptilina) y un inhibidor de la MAO A (moclobemida).
- Utilizar agonistas y antagonistas de los autorreceptores 5-HT1 A/D, así como también inhibidores de la TPH (por ejemplo, p-chlorofenilalanina).
- Profundizar en el estudio de la liberación de serotonina por estas neuronas en cultivo, como por ejemplo realizar un pre-tratamiento de los cultivos con EGTA, para evidenciar si la liberación de la serotonina es dependiente de calcio.

Referencias bibliográficas.

1. Lowell Price D; Siegel G J; Albers R W; Brady S T: *Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular and Medical Neurobiology*. Academic Press; 2012.
2. Adell a.: **Revisiting the role of raphe and serotonin in neuropsychiatric disorders.** *J Gen Physiol* 2015, **145**:257–259.
3. Bortolato M, Chen K, Shih JC: *The Degradation of Serotonin: Role of MAO. Volume 21*. Elsevier B.V.; 2010.
4. Bockaert J, Claeysen S, Bécamel C, Dumuis A, Marin P: **Neuronal 5-HT metabotropic receptors: fine-tuning of their structure, signaling, and roles in synaptic modulation.** *Cell Tissue Res* 2006, **326**:553–72.
5. Dahlstroem A, Fuxe K: **evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons.** *Acta Physiol Scand Suppl* 1964:SUPPL 232:1–55.
6. Ciranna L: **Serotonin as a modulator of glutamate- and GABA-mediated neurotransmission: implications in physiological functions and in pathology.** *Curr Neuropharmacol* 2006, **4**:101–114.
7. Praag HM: **The Harold E. Himwich Memorial Lecture. Significance of biochemical parameters in the diagnosis, treatment, and prevention of depressive disorders.** *Biol Psychiatry* 1977, **12**:101–31.
8. Arango V, Underwood MD, Gubbi A V, Mann JJ: **Localized alterations in pre- and postsynaptic serotonin binding sites in the ventrolateral prefrontal cortex of suicide victims.** *Brain Res* 1995, **688**:121–33.
9. Bondy B, Buettner A, Zill P: **Genetics of suicide.** *Mol Psychiatry* 2006, **11**:336–51.
10. Boyd JH, Weissman MM: **Epidemiology of affective disorders. A reexamination and future directions.** *Arch Gen Psychiatry* 1981, **38**:1039–46.
11. Young SN: **The use of diet and dietary components in the study of factors controlling affect in humans: a review.** *J Psychiatry Neurosci* 1993, **18**:235–44.
12. Holtzheimer PE, Nemeroff CB: **Advances in the treatment of depression.** *NeuroRx* 2006, **3**:42–56.
13. Keller MB, Lavori PW, Mueller TI, Endicott J, Coryell W, Hirschfeld RM, Shea T: **Time to recovery, chronicity, and levels of psychopathology in major depression. A 5-year prospective follow-up of 431 subjects.** *Arch Gen Psychiatry* 1992, **49**:809–16.
14. Asberg M, Träskman L, Thorén P: **5-HIAA in the cerebrospinal fluid. A biochemical suicide predictor?** *Arch Gen Psychiatry* 1976, **33**:1193–7.
15. Bach-Mizrachi H, Underwood MD, Kassir SA, Bakalian MJ, Sibille E, Tamir H, Mann JJ, Arango V: **Neuronal tryptophan hydroxylase mRNA expression in the human dorsal and median raphe nuclei: major depression and suicide.** *Neuropsychopharmacology* 2006, **31**:814–24.

16. Underwood MD, Khaibulina AA, Ellis SP, Moran A, Rice PM, Mann JJ, Arango V: **Morphometry of the dorsal raphe nucleus serotonergic neurons in suicide victims.** *Biol Psychiatry* 1999, **46**:473–83.
17. Soiza-Reilly M, Commons KG: **Unraveling the architecture of the dorsal raphe synaptic neuropil using high-resolution neuroanatomy.** *Front Neural Circuits* 2014, **8**(August):105.
18. Fu W, Le Maître E, Fabre V, Bernard JF, Xu ZQD, Hökfelt T: **Chemical neuroanatomy of the dorsal raphe nucleus and adjacent structures of the mouse brain.** *J Comp Neurol* 2010, **518**:3464–3494.
19. Harsing LG: **The pharmacology of the neurochemical transmission in the midbrain raphe nuclei of the rat.** *Curr Neuropharmacol* 2006, **4**:313–339.
20. Derkach V, Surprenant A, North RA: **5-HT₃ receptors are membrane ion channels.** *Nature* 1989, **339**:706–709.
21. Bagdy E, Solyom S, Harsing LG: **Feedback stimulation of somatodendritic serotonin release: a 5-HT₃ receptor-mediated effect in the raphe nuclei of the rat.** *Brain Res Bull* 1998, **45**:203–8.
22. Nagayasu K, Yatani Y, Kitaichi M, Kitagawa Y, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S: **Utility of organotypic raphe slice cultures to investigate the effects of sustained exposure to selective 5-HT reuptake inhibitors on 5-HT release.** *Br J Pharmacol* 2010, **161**:1527–41.
23. O’Leary OF, Bechtholt AJ, Crowley JJ, Hill TE, Page ME, Lucki I: **Depletion of serotonin and catecholamines block the acute behavioral response to different classes of antidepressant drugs in the mouse tail suspension test.** *Psychopharmacology (Berl)* 2007, **192**:357–71.
24. Aitken AR, Törk I: **Early development of serotonin-containing neurons and pathways as seen in wholemount preparations of the fetal rat brain.** *J Comp Neurol* 1988, **274**:32–47.
25. König N, Wilkie MB, Lauder JM: **Tyrosine hydroxylase and serotonin containing cells in embryonic rat rhombencephalon: a whole-mount immunocytochemical study.** *J Neurosci Res* 1988, **20**:212–223.
26. Wallace J a, Lauder JM: **Development of the serotonergic system in the rat embryo: an immunocytochemical study.** *Brain Res Bull* 1983, **10**:459–479.
27. Lautenschlager M, Höltje M, Von Jagow B, Veh RW, Harms C, Bergk a., Dirnagl U, Ahnert-Hilger G, Hörtnagl H: **Serotonin uptake and release mechanisms in developing cultures of rat embryonic raphe neurons: Age- and region-specific differences.** *Neuroscience* 2000, **99**:519–527.
28. Czesak M, Burns AM, Remes Lenicov F, Albert PR: **Characterization of rat rostral raphe primary cultures: multiplex quantification of serotonergic markers.** *J Neurosci Methods* 2007, **164**:59–67.
29. Galter D, Unsicker K: **Regulation of the transmitter phenotype of rostral and caudal groups of cultured serotonergic raphe neurons.** *Neuroscience* 1999, **88**:549–

59.

30. Patel BA, Arundell M, Parker KH, Yeoman MS, O'Hare D: **Simple and rapid determination of serotonin and catecholamines in biological tissue using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection.** *J Chromatogr B* 2005, **818**:269–276.
31. Cheng F-C, Kuo J-S: **High-performance liquid chromatographic analysis with electrochemical detection of biogenic amines using microbore columns.** *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1995, **665**:1–13.
32. Mefford IN: **Application of high performance liquid chromatography with electrochemical detection to neurochemical analysis: measurement of catecholamines, serotonin and metabolites in rat brain.** *Journal of Neuroscience Methods* 1981:207–224.
33. Nagayasu K, Kitaichi M, Nishitani N, Asaoka N, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S: **Chronic effects of antidepressants on serotonin release in rat raphe slice cultures: high potency of milnacipran in the augmentation of serotonin release.** *Int J Neuropsychopharmacol* 2013, **16**:2295–306.
34. Paxinos G: *Atlas of the Developing Rat Nervous System. Volume 186; 1995*(Pt 3).
35. Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ: **Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination.** *J Neurosci Res* 1993, **35**:567–76.
36. Chugani DC: **α -methyl- L -tryptophan: mechanisms for tracer localization of epileptogenic brain regions.** *Biomark Med* 2011, **5**:567–575.
37. Bel N, Artigas F: **Fluvoxamine preferentially increases extracellular 5-hydroxytryptamine in the raphe nuclei: an in vivo microdialysis study.** *Eur J Pharmacol* 1992, **229**:101–3.
38. Malagié I, Trillat AC, Jacquot C, Gardier AM: **Effects of acute fluoxetine on extracellular serotonin levels in the raphe: an in vivo microdialysis study.** *Eur J Pharmacol* 1995, **286**:213–7.
39. Buller KM, Wixey J a., Reinebrant HE: **Disruption of the Serotonergic System after Neonatal Hypoxia-Ischemia in a Rodent Model.** *Neurol Res Int* 2012, **2012**:1–12.

Anexo 1: soluciones.

1. Cultivos de romboencéfalo

1.1. Medio de cultivo Neurobasal 1X:

(datos tomados de Thermo Fisher Scientific Inc.)

Components	Molecular Weight	Concentration (mg/L)	mM
<i>Amino Acids</i>			
Glycine	75.0	30.0	0.4
L-Alanine	89.0	2.0	0.02247191
L-Arginine	211.0	84.0	0.39810428
hydrochloride			
L-Asparagine-	150.0	0.83	0.0055333334
H2O			
L-Cysteine	121.0	31.5	0.2603306
L-Histidine	210.0	42.0	0.2
hydrochloride-			
H2O			
L-Isoleucine	131.0	105.0	0.8015267
L-Leucine	131.0	105.0	0.8015267
L-Lysine	183.0	146.0	0.7978142
hydrochloride			
L-Methionine	149.0	30.0	0.20134228
L-Phenylalanine	165.0	66.0	0.4
L-Proline	115.0	7.76	0.06747826
L-Serine	105.0	42.0	0.4
L-Threonine	119.0	95.0	0.79831934
L-Tryptophan	204.0	16.0	0.078431375
L-Tyrosine	181.0	72.0	0.39779004
L-Valine	117.0	94.0	0.8034188
<i>Vitamins</i>			
Choline chloride	140.0	4.0	0.028571429
D-Calcium	477.0	4.0	0.008385744
pantothenate			
Folic Acid	441.0	4.0	0.009070295
Niacinamide	122.0	4.0	0.032786883
Pyridoxal	204.0	4.0	0.019607844
hydrochloride			
Riboflavin	376.0	0.4	0.0010638298
Thiamine	337.0	4.0	0.011869436
hydrochloride			
Vitamin B12	1355.0	0.0068	5.02E+01
i-Inositol	180.0	7.2	0.04
<i>Inorganic Salts</i>			
Calcium Chloride	111.0	200.0	18.018.018
(CaCl ₂) (anhyd.)			
Ferric Nitrate	404.0	0.1	2.48E+03
(Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)			
Magnesium	95.0	77.3	0.8136842
Chloride			
(anhydrous)			
Potassium	75.0	400.0	53.333.335
Chloride (KCl)			
Sodium	84.0	2200.0	26.190.475
Bicarbonate			
(NaHCO ₃)			
Sodium Chloride	58.0	3000.0	51.724.136
(NaCl)			

Sodium Phosphate monobasic (NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O)	138.0	125.0	0.9057971
Zinc sulfate (ZnSO ₄ -7H ₂ O)	288.0	0.194	6,74E+02
Other Components			
D-Glucose (Dextrose)	180.0	4500.0	25.0
HEPES	238.0	2600.0	1.092.437
Phenol Red	376.4	8.1	0.021519661
Sodium Pyruvate	110.0	25.0	0.22727273

1.2. B27:

(datos obtenidos de Thermo Fisher Scientific Inc.)

Components	Molecular Weight	Concentration (mg/L)	mM
Vitamins			
Biotin		Confidential	n/a
DL Alpha Tocopherol Acetate		confidential	n/a
DL Alpha-Tocopherol		confidential	n/a
Vitamin A (acetate)		confidential	n/a
Proteins			
BSA, fatty acid free Fraction V		confidential	n/a
Catalase		confidential	n/a
Human Recombinant Insulin		confidential	n/a
Human Transferrin		confidential	n/a
Superoxide Dismutase		confidential	n/a
Other Components			
Corticosterone		confidential	n/a
D-Galactose		confidential	n/a
Ethanolamine HCl		confidential	n/a
Glutathione (reduced)		confidential	n/a
L-Carnitine HCl		confidential	n/a
Linoleic Acid		confidential	n/a
Linolenic Acid		confidential	n/a
Progesterone		confidential	n/a
Putrescine 2HCl		confidential	n/a
Sodium Selenite		confidential	n/a
T3 (triiodo-L-thyronine)		confidential	n/a

1.3. Buffer de Krebs- Ringer Glucosa-Hepes (KBH) (10 X)

(Tomado de Nagayasu et al, 2010.)

Para 10 ml:

NaCl	1460 Mm	0,853 g
KCl	27 mM	0,0201 g
MgCl	10 mM	0,0203 g
CaCl ₂	12 mM	0,0133 g
D-glucosa	100 mM	0,1802 g
Hepes	200 mM	0,476 g
Ácido ascórbico	2 mM	0,00396 g

Ajustar el pH a pH=7,4 en 8 ml de agua mili Q con NaOH. Posteriormente llevar a 10 ml con agua mili Q y se filtra en el cuarto de cultivo. Para los tratamientos debe diluirse en agua estéril.

2. Soluciones utilizadas para la cuantificación de serotonina y 5-HIAA por HPLC-ED

2.1. Fase móvil HPLC-ED

Para 500 ml:

- 1) 15,7 g de ácido cítrico en 400 ml de agua ultrapura (mili Q).
- 2) Ajuste de pH a pH=3 con NaOH.
- 3) Llevar a volumen de 477,5 ml con agua miliQ.
- 4) Filtrar y degasear.
- 5) Agregar 90 mg de octil sulfato de sodio (SOS).
- 6) Agregar: 15 ml de Acetonitrilo y 7,5 ml de Tetrahidrofurano.
- 7) Dejar estabilizando el sistema por 24 horas.

2.2. Solución estándar de serotonina y 5-HIAA

- 1) Solución A: DOPAC, dopamina, HVA, serotonina y 5-HIAA.
- 2) Solución B: 7500 µL de PCA 0,1 M y 50 µL de cada solución A (volumen final de 10 mL).
- 3) Solución C: 1200 µL de PCA 0,1 M y 50 µL de la solución B (volumen final de 1250 µL).
- 4) Solución D: 950 µL de PCA 0,1 M y 50 µL de la solución C (volumen final de 1000 µL).
- 5) Se inyectan 50 µl, lo que equivale a 5 ng de serotonina y 5 ng de 5-HIAA.

Anexo 2: datos.

1. Cuantificación de las neuronas serotoninérgicas en cultivo de 7 DIV.

	N° total células por pocillo (Hoechst positivas)	N° de neuronas 5- HT positivas	% 5 HT
Cultivo 1	2511,5	53,3	1,6
Cultivo 2	2191,1	37,5	1,7
Cultivo 3	1708,2	12,0	0,7
Promedio total (n=3)	2136,93 ± 404,38	34,26 ± 20,83	1,33 ± 0,55

2. Cuantificación de las neuronas serotoninérgicas en cultivo de 14 DIV.

	N° total células por pocillo (Hoechst positivas)	N° de neuronas 5- HT positivas	% 5 HT
Cultivo 1-15	1141	35,0	3,07
Cultivo 2-15	1683,5	27,5	1,63
Cultivo 3-15	1589,6	35,6	2,24
Cultivo 4-15	1762,5	20,0	1,13
Cultivo 7-15	951	26,5	2,79
Cultivo 9-15	1014	20,0	1,97
Cultivo 12-15	548	5,0	0,91
Cultivo 13-15	579,5	9,0	1,55
Promedio total (n=8)	1158,6 ± 477,9	22,3 ± 11,1	1,91 ± 0,76

3. Niveles de 5-HIAA en respuesta a la estimulación con citalopram en cultivo de 14 DIV.

	Concentración de 5-HIAA medio (ng/μl)	Concentración de 5-HIAA células (ng//μl)
Control	0,85 ± 0.31	0,13 ± 0.04
Cit 0,1 μM	0,49 ± 0,24	0,06 ± 0,02
Cit 1 μM	0,43 ± 0,31	0,06 ± 0,02
Cit 10 μM	0,39 ± 0,29	0,06 ± 0,02

Cit 100 μM	0,44 ± 0,32	0,07 ± 0,02
---------------	-------------	-------------

4. Niveles de 5-HT en respuesta a la estimulación con citalopram en cultivo

	Concentración de 5-HT medio (ng/μl)	Concentración de 5-HT células (ng//μl)
Control	0,03 ± 0,02	0,69 ± 0,39
Cit 0,1 μM	0,10 ± 0,05	0,88 ± 0,47
Cit 1 μM	0,24 ± 0,03	0,72 ± 0,36
Cit 10 μM	0,20 ± 0,06	0,59 ± 0,32
Cit 100 μM	0,15 ± 0,06	0,47 ± 0,27

de 14 DIV.

