

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS**



**“AGONISTAS DE RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS ACTIVAN  
CASCADAS TRANSDUCCIONALES INVOLUCRADAS EN LA  
REGULACIÓN DEL CITOESQUELETO Y PRODUCEN CAMBIOS  
EN LA MORFOLOGÍA DE NEURONAS HIPOCAMPALES EN  
CULTIVO”**

**Tesis entregada a la Universidad de Chile  
para optar al Grado de Doctor en Farmacología por:**

**PAULINA SOLEDAD ROJAS DOMÍNGUEZ**

**Directores de Tesis**

**Dra. Jenny Fiedler Temer**

**Dr. Sergio Lavandero González**

**SANTIAGO-CHILE  
2013**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN**  
**Tesis de Doctorado**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis presentada por el candidato:

**PAULINA SOLEDAD ROJAS DOMÍNGUEZ**

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de la Tesis como requisito para optar al Grado de Doctor en Farmacología, en el examen de defensa de Tesis rendido el día:

**Directores de Tesis:**

Dra. Jenny Fiedler T. \_\_\_\_\_

Dr. Sergio Lavandero G. \_\_\_\_\_

**Comisión Informante:**

Dr. Guillermo Díaz (Presidente) \_\_\_\_\_

Dra. Ana María Cárdenas \_\_\_\_\_

Dra. Úrsula Wyneken \_\_\_\_\_

Dra. María Inés Forray \_\_\_\_\_

Dr. Christian González \_\_\_\_\_

Esta Tesis fue financiada por el proyecto FONDECYT 108-0489, Proyecto FONDAP 15010006, Beca de apoyo de tesis doctoral AT-24080056, y ha dado origen a las siguientes comunicaciones y publicaciones durante el período de ejecución de la tesis.

### **Presentaciones en congresos científicos**

Jenny Lucy Fiedler, **Paulina Rojas**, David Neira, Sergio Lavandero.

Serotonin regulates dendritic morphology through the involvement of 5HT<sub>1A</sub> and 5HT<sub>7</sub> receptors in primary culture of rat hippocampus.

VII Reunión Anual de la Sociedad chilena de neurociencia. 27-19 de septiembre del 2011 Santa cruz, Chile.

**Rojas, PS.** Neira, D. Lavandero, S. Fiedler, JL.

Receptores 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>7</sub> y su rol en vías transduccionales que modulan el citoesqueleto en cultivo primario de neuronas de hipocampo de rata.

XXXII Reunión Anual de la Sociedad de Farmacología. Concepción, Chile. Noviembre del 2010. Valdivia, Chile.

**Rojas, PS.** Neira, D. Lavandero, S. Fiedler, JL.

Activación de receptores serotoninérgicos y regulación de la morfología neuronal en cultivo primario de neuronas de hipocampo de rata.

XXXI Congreso Anual Sociedad de Farmacología de Chile. Octubre del 2009. Concepción, Chile.

### **Artículos científicos**

Serum brain-derived neurotrophic factor and glucocorticoid receptor levels in lymphocytes as markers of antidepressant response in major depressive patients: A pilot study. Paulina Soledad Rojas, Rosemarie Fritsch, Romina Andrea Rojas, Pablo Jara, Jenny Lucy Fiedler. Psychiatry Research 189 (2011) 239–245.

*Dedicado con amor a mi familia*

## **Agradecimientos**

Agradezco de manera muy especial a mi linda familia a quienes amo profundamente: mis papas, mi hermanita Bárbara, mi cuñado Álvaro, mi hermosa sobrinita Josefa que ha sido una bendición en nuestras vidas y a mi amado Rodrigo quien ha estado siempre a mi lado. Gracias por el apoyo, comprensión, consejos, paciencia y entregarme tanto cariño y amor que sin él no habría podido cumplir esta meta. No existe nada en el mundo más importante para mí que cada uno de ustedes.

Mis más sinceros agradecimientos a quien ha sido fundamental en mi formación profesional, a mi directora de Tesis la Dra. Jenny Fiedler, por quien siento un gran cariño y admiración. Gracias Profe Jenny por estar siempre junto a mí, por su tiempo, dedicación y por todo lo que me ha transmitido a través de su conocimiento y experiencia.

Agradezco a mi Director de Tesis el Dr. Sergio Lavandero por su apoyo en objetivos fundamentales para el desarrollo de mi trabajo.

A mis compañeros del laboratorio de Neuroplasticidad y Neurogenética: Valentina, Mauricio, Aníbal, Sebastián y Sra. Rafaela.

A quienes he conocido durante mi estadía en el laboratorio: Karina, José Luis (Coto), Patricia, Natalia, Dámaris, Clarita, Javier y en forma muy especial a David.

A mis amigos del Doctorado en Farmacología: Romina, Sergio, Catalina, Rodrigo, Viviana y Leticia.

Gracias a todos por su apoyo, amistad y gratos momentos que guardo con mucho cariño en mi corazón.

A Don Fidel por prestarme su ayuda cada vez que la necesité.

A la comisión de Doctorado por sus valiosos aportes durante el desarrollo de mi Tesis.

Agradezco a CONICYT y al posgrado de la Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas por financiar parte de mi Doctorado.

Le doy gracias a Dios por darme las fuerzas necesarias para terminar esta etapa. Ha sido un camino largo y difícil, pero de gran aprendizaje, que sin duda alguna me enriquece a nivel personal y profesional.

*Paz y Bien*

## ÍNDICE GENERAL

Página

ÍNDICE GENERAL .....	i
ÍNDICE DE FIGURAS .....	iv
ÍNDICE DE TABLAS .....	vii
ABREVIATURAS .....	viii
RESUMEN .....	x
SUMMARY .....	xii
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Receptores serotoninérgicos durante el desarrollo .....	4
1.2 Cascadas transduccionales relacionadas a la activación de receptores serotoninérgicos.....	8
1.3 Receptores serotoninérgicos y cambios en la morfología neuronal.....	14
2. HIPÓTESIS .....	17
3. OBJETIVOS.....	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	18
4.1 Reactivos generales .....	18
4.2 Animales.....	18
4.3 Cultivo primario de neuronas hipocampales.....	19
4.4 Estrategia farmacológica utilizada .....	20
4.5 Obtención de extractos neuronales.....	22
4.6 Electroforesis y Western blot.....	22
4.7 Inmunocitoquímica.....	25
4.8 Cuantificación del largo y número de dendritas y análisis de Sholl.....	26
4.9 Análisis de imágenes.....	27
4.10 Análisis estadístico.....	29
5. RESULTADOS.....	32
5.1 Caracterización de la morfología de neuritas a los 3 DIV.....	32
5.2 Evolución de los niveles y distribución de los receptores serotoninérgicos 5HT <sub>1A</sub> y 5HT <sub>7</sub> en neuronas hipocampales en función de los días de cultivo.....	38
5.3 Determinación de la concentración y temporalidad de los estímulos con agonistas serotoninérgicos 8OH-DPAT a los 2 DIV.....	44
5.3.1 Efectos de los antagonistas serotoninérgicos sobre el estímulo con 8OH-DPAT en cultivo de hipocampo de rata a los 2 DIV.....	45
5.4 Efectos de los agonistas serotoninérgicos sobre la morfología de neuritas a los 3DIV.....	48

5.4.1	Efectos sobre la morfología neuronal del 8OH-DPAT y de los antagonistas WAY-100635 y SB269970.....	48
5.4.2	Efecto del 8OH-DPAT sobre el número de neuritas.....	49
5.4.3	Efecto del 8OH-DPAT sobre el largo dendrítico total y promedio de neuritas.....	53
5.4.4	Efectos sobre la morfología neuronal de la serotonina y de los antagonistas WAY-100635 y SB269970.....	56
5.4.5	Efecto de la serotonina sobre el número de neuritas, largo total y largo promedio.....	59
5.5	Comparación de la morfología dendrítica entre cultivos de 3-8 DIV.....	64
5.6	Determinación de los antagonistas serotoninérgicos sobre vías transduccionales y su relación con la morfología neuronal a los 7 DIV.....	67
5.6.1	Efecto de la concentración y temporalidad de la estimulación con agonistas serotoninérgicos y su prevención por antagonistas.....	67
5.7	Efectos de los antagonistas serotoninérgicos sobre la morfología dendrítica a los 8 DIV.....	71
5.7.1	Efectos del 8OH-DPAT y los antagonistas WAY y SB269970.....	76
5.7.2	Efecto del 8OH-DPAT sobre el número, largo total y largo promedio de dendritas.....	76
5.7.3	Efecto de la serotonina y los antagonistas WAY y SB269970.....	78
5.7.4	Efecto de la serotonina sobre el número, largo dendrítico total y largo dendrítico promedio.....	85
6.	DISCUSIÓN.....	89
6.1	Distribución del receptor 5HT <sub>1A</sub> en cerebro durante el desarrollo y en adultez...	90
6.2	Niveles y distribución celular del receptor 5HT <sub>1A</sub> en cultivos hipocámpales...	91
6.3	Receptor 5HT <sub>1A</sub> y su asociación a cascadas transduccionales: modelos neuronales y no neuronales.....	92
6.3.1	Activación del receptor 5HT <sub>1A</sub> y su relación con la actividad adenilato ciclasa.....	93
6.3.2	Activación del receptor 5HT <sub>1A</sub> y su relación con la vía de las MAPK	94
6.3.3	Activación del receptor 5HT <sub>1A</sub> y su relación con la vía de las PI3K AKT-GSK-3β.....	97
6.4	Distribución del receptor 5HT <sub>7</sub> en cerebro adulto.....	103
6.5	Expresión y distribución celular del receptor 5HT <sub>7</sub> en cerebro en desarrollo pre y posnatal.....	104
6.6	Receptor 5HT <sub>7</sub> y activación de cascadas transduccionales: modelos neuronales y no neuronales.....	105
6.6.1	Activación del receptor 5HT <sub>7</sub> y su relación con la vía de las MAPK	105
6.6.2	Activación del receptor 5HT <sub>7</sub> y su relación con la vía de las PI3K-AKT-GSK-3β.....	107
6.7	Factores que dificultan el conocimiento del acoplamiento entre receptores serotoninérgicos y sus efectores en neuronas.....	109
6.8	Rol de la serotonina en la regulación de la morfología neuronal.....	111
6.8.1	El receptor inotrópico 5HT <sub>3</sub> y metabotrópico 5HT <sub>4</sub> regulan la morfología neuronal.....	111

6.8.2 Receptores 5HT <sub>1A</sub> y 5HT <sub>7</sub> : relación con cambios en la morfología neuronal.....	112
6.9 Modelo hipotético de los cambios morfológicos inducidos por la actividad de receptores serotoninérgicos.....	120
7. LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	124
8. CONCLUSIONES.....	125
9. PROYECCIONES DEL ESTUDIO.....	126
10. BIBLIOGRAFÍA.....	127

## ÍNDICE DE FIGURAS

## Página

<b>Figura 1</b>	Mirada integral de la señalización de la neurona serotoninérgica.....	6
<b>Figura 2</b>	Vías transduccionales asociadas a la activación del receptor serotoninérgico 5HT <sub>1A</sub> sobre expresado en líneas celulares no neuronales.....	10
<b>Figura 3</b>	Vías transduccionales asociadas a la activación del receptor serotoninérgico 5HT <sub>7</sub> sobre expresado en líneas celulares no neuronales.....	13
<b>Figura 4</b>	Imágenes representativas de los cultivos de neuronas de hipocampo de rata a los 8 DIV con y sin inhibidor de mitosis.....	20
<b>Figura 5</b>	Resumen de la estrategia farmacológica utilizada en cultivos primario de neuronas hipocampales.....	20
<b>Figura 6</b>	Cuantificación de largo y número de neuritas/dendritas de neuronas Hipocampales.....	28
<b>Figura 7</b>	Análisis de Sholl de neuronas hipocampales.....	30
<b>Figura 8</b>	Resumen de la estrategia utilizada para el análisis de imágenes y determinación de cambios morfológicos.....	31
<b>Figura 9</b>	Estadíos del desarrollo de neuronas hipocampales en cultivo.....	33
<b>Figura 10</b>	Determinación de los niveles de la proteína Akt y GSK3 $\beta$ durante los días de cultivo in vitro de neuronas de hipocampo de rata E18 por Western.....	34
<b>Figura 11</b>	Análisis de Sholl de cultivos primarios hipocampales de 3DIV.....	36
<b>Figura 12</b>	Número y largo de neuritas en cultivos primarios hipocampales a los 3 DIV.....	37
<b>Figura 13</b>	Niveles del receptor 5HT <sub>1A</sub> durante la evolución del cultivo mediante la técnica de Western.....	40
<b>Figura 14</b>	Niveles del receptor 5HT <sub>7</sub> durante la evolución del cultivo mediante la técnica de Western.....	41
<b>Figura 15</b>	Distribución de los receptores serotoninérgicos 5HT <sub>1A</sub> , 5HT <sub>7</sub> en cultivos primarios hipocampales mediante inmunocitoquímica a los 4 DIV.....	42
<b>Figura 16</b>	Distribución de los receptores serotoninérgicos 5HT <sub>1A</sub> , 5HT <sub>7</sub> en cultivos primarios hipocampales mediante inmunocitoquímica a los 8 DIV.....	45
<b>Figura 17</b>	Temporalidad del cambio en el estado de la fosforilación de Akt, GSK-3 $\beta$ y cofilina promovida por el agonista 8OH-DPAT.....	46
<b>Figura 18</b>	Efecto de los antagonistas WAY-100635 y SB269970 sobre los cambios en el estado de fosforilación de Akt, GSK-3 $\beta$ y cofilina promovida por el 8OH-DPAT a los 2 DIV.....	47
<b>Figura 19</b>	Imágenes representativas de neuronas con 3 DIV utilizadas para medición de morfología de neuritas.....	50
<b>Figura 20</b>	Efecto del 8OH-DPAT sobre la complejidad neuronal de cultivos primarios de hipocampo de rata 3 DIV.....	51

<b>Figura 21</b>	Efecto de la estimulación con 8OH-DPAT sobre el número de neuritas primarias, secundarias y terciarias por neurona a los 3 DIV.....	52
<b>Figura 22</b>	Efecto de la estimulación con 8OH-DPAT sobre el largo total de neuritas por neurona a los 3 DIV.....	54
<b>Figura 23</b>	Efecto de la estimulación con 8OH-DPAT sobre el largo promedio de neuritas por neurona a los 3 DIV.....	55
<b>Figura 24</b>	Imágenes representativas de neuronas con 3 DIV utilizadas para medición de morfología de neuritas.....	57
<b>Figura 25</b>	Efecto de la 5-HT sobre la complejidad neuronal de cultivos primarios de hipocampo de rata 3 DIV.....	58
<b>Figura 26</b>	Efecto de la estimulación con 5-HT sobre el número de neuritas primarias, secundarias y terciarias por neurona a los 3 DIV.....	60
<b>Figura 27</b>	Efecto de la estimulación con 5-HT sobre el largo total de neuritas por neurona a los 3 DIV.....	61
<b>Figura 28</b>	Efecto de la estimulación con 5-HT sobre el largo promedio de neuritas por neurona a los 3 DIV.....	62
<b>Figura 29</b>	Comparación entre cultivos primarios hipocampales de 3 y 8 DIV mediante el análisis de Sholl.....	65
<b>Figura 30</b>	Comparación del número y largo de dendritas entre cultivos primarios hipocampales a los 3 y 8 DIV.....	66
<b>Figura 31</b>	Temporalidad del cambio en el estado de la fosforilación de Akt, GSK3 $\beta$ y cofilina promovida por el agonista 8OH-DPAT.....	68
<b>Figura 32</b>	Efecto de los antagonistas WAY y SB269970 sobre los cambios en el estado de fosforilación de AKT, GSK3 $\beta$ y cofilina promovida por los agonistas 8OH-DPAT y 5HT a los 7 DIV.....	69
<b>Figura 33</b>	Efecto de los antagonistas WAY y SB269970 sobre los cambios en el estado de fosforilación de AKT, GSK3 $\beta$ y cofilina promovida por los agonistas 8OH-DPAT y 5-HT a los 7 DIV.....	70
<b>Figura 34</b>	Efecto de los antagonistas WAY y SB269970 sobre los cambios en el estado de fosforilación de ERK promovida por los agonistas 8OH-DPAT y 5-HT a los 7 DIV.....	72
<b>Figura 35</b>	Efecto de los antagonistas WAY y SB269970 sobre los cambios en el estado de fosforilación de ERK promovida por los agonistas 8OH-DPAT y 5HT a los 7 DIV.....	73
<b>Figura 36</b>	Efecto de los antagonistas WAY y SB269970 sobre los cambios en el estado de fosforilación de AKT, GSK-3 $\beta$ y cofilina promovida por 5HT a los 7 DIV, en células sembradas a baja densidad.....	74
<b>Figura 37</b>	Efecto de los antagonistas WAY y SB269970 sobre los cambios en el estado de fosforilación de ERK promovida por 5-HT a los 7 DIV, en células sembradas a baja densidad.....	75
<b>Figura 38</b>	Imágenes representativas de neuronas 8 DIV utilizadas para medición de morfología dendrítica.....	77
<b>Figura 39</b>	Efecto del 8OH-DPAT sobre la complejidad dendrítica de cultivos primarios hipocampales a los 8 DIV.....	79

<b>Figura 40</b>	Efecto de la estimulación con 8OH-DPAT sobre el número de dendritas primarias, secundarias y terciarias por neurona a los 8DIV.....	80
<b>Figura 41</b>	Efecto de la estimulación con 8OH-DPAT sobre el largo dendrítico total por neurona a los 8 DIV.....	81
<b>Figura 42</b>	Efecto de la estimulación con 8OH-DPAT sobre el largo dendrítico promedio por neurona a los 8 DIV.....	82
<b>Figura 43</b>	Imágenes representativas de neuronas 8 DIV utilizadas para medición de morfología dendrítica.....	83
<b>Figura 44</b>	Efecto de la 5HT sobre la complejidad dendrítica de cultivos primarios de hipocampo de rata 8 DIV.....	84
<b>Figura 45</b>	Efecto de la estimulación con 5-HT sobre el número de dendritas primarias, secundarias y terciarias por neurona a los 8 DIV.....	86
<b>Figura 46</b>	Efecto de la estimulación con 5-HT sobre el largo dendrítico total por neurona a los 8 DIV.....	87
<b>Figura 47</b>	Efecto de la estimulación con 5-HT sobre el largo dendrítico promedio por neurona a los 8 DIV.....	88
<b>Figura 48</b>	Vías transduccionales asociadas a la activación del receptor serotoninérgicos 5HT <sub>1A</sub> en líneas celulares no neuronales y en neuronas.....	102
<b>Figura 49</b>	Vías transduccionales asociadas a la activación del receptor serotoninérgicos 5HT <sub>7</sub> en líneas celulares no neuronales y en neuronas.....	110
<b>Figura 50</b>	Resumen de los cambios morfológicos en neuritas y dendritas asociados a los receptores 5HT <sub>1A</sub> y 5HT <sub>7</sub> .....	119
<b>Figura 51</b>	Modelo hipotético de la activación de los receptores 5HT <sub>1A</sub> y 5HT <sub>7</sub> y vías que controlan el citoesqueleto neuronal.....	123

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>		<b>Página</b>
<b>Tabla 1</b>	Receptores serotoninérgicos en el cerebro humano: Transducción, distribución, funciones putativas y patologías relacionadas.....	7
<b>Tabla 2</b>	Constantes de inhibición (K <sub>i</sub> ) de agonistas y antagonistas serotoninérgicos utilizados.....	21
<b>Tabla 3</b>	Anticuerpos y condiciones utilizadas para la determinación de las proteínas por Western.....	24
<b>Tabla 4</b>	Anticuerpos utilizados para inmunocitoquímica.....	26

## ABREVIATURAS

AC	: Adenilato ciclasa
CA	: Cuerno de Ammon
Akt	: Proteína quinasa B
AMPc	: Adenosín monofosfato cíclico
ARN m	: Ácido ribonucleico mensajero
BDNF	: Factor neurotrófico derivado de cerebro
BSA	: Albúmina de suero de bovino
Cdc42	: Cell division control protein 42 homolog
CHO	: Células derivadas de ovario de hámster chino
CRMP2	: Proteína mediadora de la respuesta de colapsina-2
5-CT	: 5-Carboxamidotriptamina
DAG	: Diacil glicerol
DIV	: Días <i>in vitro</i>
DMEM	: Medio de Eagle Modificado por Dulbecco
8OH-DPAT	: 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino) tetralina
EDTA	: Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	: Ácido etilen glicol tetraacético
ERK	: Quinasa regulada extracelularmente
PLC	: Fosfolipasa C
FURD/uridina	: 5-fluoro-2-deoxiuridina/uridina
GD	: Giro dentado
GDP	: Guanosin difosfato
GEF	: Factor intercambiador de nucleótidos de Guanina
GIRK	: Canal rectificador de potasio
GSK-3 $\beta$	: Quinasa Glicógeno sintetasa beta 3
GTP	: Guanosin trifosfato
IP3	: Inositol trifosfato
ISRS	: Inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina
HEK293	: Células embrionarias humanas del riñón
HEPES	: 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineethanesulfonic acid
5-HT	: Serotonina
5-HTT	: Transportador de serotonina
Ki	: Constante de inhibición
LIMK	: Proteína quinasa con dominios LIM
MAO	: Mono Amino Oxidasa
MAP2	: Proteína asociada a microtubulo-2
PBS	: Tampón fosfato salino
PCA	: p-clorofenilalanina
PI3K	: Fosfatidil inositol quinasa-3
PC12	: Línea Celular del Feocromocitoma
IP3	: inositol trifosfato-(3,4,5)

PKA	: Proteína quinasa A
PKC	: Proteína quinasa C
RTK	: Receptor tirosina quinasa
SB269970	: (2R)-1 [(3-hidroxifenil)sulfonil]-2-[2-(4-metil-1-piperidinil)etil]pirrolidina hidrocloreto
SDS	: Dodecil sulfato de sodio
SNC	: Sistema nervioso central
Src	: Proteína tirosina quinasa de sarcoma de Rous
TBS	: Tampón Salino Tris-Borato
TEMED	: Tetrametiletilenediamina
Tph2	: Triptofano hidroxilasa 2
WAY-100635	: N-{2-[4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil]etil}-N-2-piridinilciclohexanocarboxamida

## RESUMEN

La Serotonina (5-HT) es un neurotransmisor detectado tempranamente durante el desarrollo del sistema nervioso central y recientemente se ha descrito su papel sobre los procesos de migración y morfología neuronal. Mediante la inhibición farmacológica de la síntesis de 5-HT durante el desarrollo embrionario, se ha determinado que la reducción en este neurotransmisor produce efectos a largo plazo reflejado en una disminución del peso del cerebro, alteración en la maduración neuronal y una disminución de la complejidad dendrítica.

La 5-HT ejerce sus acciones a través de sus receptores ionotrópicos (5HT3) y metabotrópicos (5HT<sub>1</sub>, 5HT<sub>2</sub>, 5HT<sub>4</sub>-5HT<sub>7</sub>). Algunos de ellos se expresan tempranamente durante el desarrollo embrionario y más aún puede variar su distribución y/o niveles en forma dinámica durante el desarrollo pre y posnatal. Para efectos de esta Tesis se destacan los receptores 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>7</sub> los cuales están presentes en estructuras cerebrales como el hipocampo. Interesantemente, el 5HT<sub>1A</sub>-R se expresa tempranamente durante el desarrollo embrionario; por lo cual se postula que la 5-HT tendría un efecto modulador sobre la migración, diferenciación y viabilidad celular. En cambio, solo se ha descrito una expresión dinámica del 5HT<sub>7</sub>-R durante el desarrollo posnatal; lo que sugiere una acción de este receptor en estadios bien definidos.

La sobre-expresión de los receptores serotoninérgicos 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>7</sub> en líneas celulares, ha permitido estudiar su acoplamiento a distintas cascadas transduccionales. Se ha descrito el acoplamiento a diversas proteínas G que permiten la activación o inhibición de proteínas efectoras como AC, fosfolipasas, regulación de canales iónicos y activación de las vías MAPK y PI3K-Akt, entre otras. Estas vías participan promoviendo la formación de neuritas y dendritas y han sido involucradas con la regulación de la plasticidad sináptica. En contraste, los efectores de estos receptores descritos en líneas celulares no han sido bien definidos en neuronas. Si bien existen algunos antecedentes que apoyan la idea de que la 5-HT regula la morfología neuronal, no se ha establecido la participación de un subtipo de receptor en particular. La activación del 5HT<sub>1A</sub>-R induce un aumento en el número y largo de neuritas en neuroblastoma de ratón. En relación a estos cambios morfológicos, se ha descrito que la vía de las Rho GTPasas regula el citoesqueleto a través de la modulación de la cofilina, importante regulador del citoesqueleto de actina. Se ha demostrado un acoplamiento entre el 5HT<sub>7</sub>-R y Gα<sub>12</sub> y el aumento del crecimiento de neuritas en neuronas hipocampales, aunque no se ha dilucidado cuáles son sus efectores río abajo.

De acuerdo a estos antecedentes se postuló la siguiente hipótesis: “Agonistas de los receptores 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>7</sub> activan vías transduccionales que modulan el citoesqueleto, efectos que se asocian a cambios morfológicos de neuronas hipocampales en cultivos”. Los objetivos fueron: 1) Determinar en neuronas hipocampales con distinta madurez, el efecto de agonistas de los receptores serotoninérgicos 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>7</sub> sobre proteínas que participan en vías transduccionales, que tienen como blanco el citoesqueleto de microtúbulos y de actina, como Akt-GSK-3β, ERK y cofilina, respectivamente. 2) Determinar el efecto de agonistas de los receptores serotoninérgicos 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>7</sub> sobre la morfología de neuronas hipocampales con distinta madurez. Estos objetivos se desarrollaron utilizando antagonistas específicos para los receptores 5HT<sub>1A</sub> (WAY-100635) y 5HT<sub>7</sub> (SB269970). En esta tesis se demostró que la distribución del receptor 5HT<sub>1A</sub> experimenta una polarización a mayor madurez del cultivo, encontrándose tempranamente en el soma y más tardíamente con una localización somato-

dendrítica, sin variar el nivel del receptor. En contraste, la distribución somato-dendrítica del 5HT<sub>7</sub>-R fue independiente de la madurez del cultivo. A su vez, se detectaron las isoformas 5HT<sub>7a</sub>-R y 5HT<sub>7b</sub>-R y cuya relación no varió durante los días del cultivo *in vitro* (DIV). No obstante, ambas isoformas aumentan significativamente entre los 2 y 14 DIV. El 8OH-DPAT, agonista de los receptores 5HT<sub>1A</sub> (Ki 10 nM) y 5HT<sub>7</sub> (Ki 52 nM), promueve la activación de la vía Akt-GSK-3 $\beta$  a los 2 DIV, efecto que involucraría la participación del 5HT<sub>7</sub>-R y, probablemente al 5HT<sub>1A</sub>-R. Adicionalmente, el 8OH-DPAT en neuronas más maduras (7 DIV), aumentó la activación de la Akt, efecto independiente de los receptores 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>7</sub>. Estos resultados sugieren que este agonista puede activar a otros receptores, lo que plantea una reevaluación de su acción como agonista selectivo del 5HT<sub>1A</sub>. Por otra parte, a pesar de la activación de la Akt, no se observaron cambios en la fosforilación de la GSK-3 $\beta$ , sugiriendo una disociación de ambas quinasas a este estadio. Adicionalmente, el 8OH-DPAT ó la 5-HT no modificaron significativamente el estado de fosforilación de las ERK1/2.

La estimulación durante 24 horas con 8OH-DPAT en neuronas con 2 DIV aumentó significativamente el número de las neuritas primarias, acompañado de un aumento en el largo neurítico total; efectos no asociados a los receptores 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>7</sub>. Estos resultados sugieren que el 8OH-DPAT activa un receptor que incrementa el número de neuritas sin afectar su largo. Interesantemente, se observó que la estimulación con 8OH-DPAT disminuyó significativamente la fosforilación inactivante de la cofilina en Ser<sup>3</sup>; efecto insensible a la acción de los antagonistas de los receptores 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>7</sub>. Similarmente, a los 7 DIV se observó una disminución significativa de los niveles fosforilados de cofilina luego de la estimulación con 5-HT, efecto no asociado a los receptores 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>7</sub>, sugiriendo la participación de un receptor serotoninérgico desconocido sobre la dinámica de actina.

Adicionalmente, la activación del 5HT<sub>7</sub>-R con 8OH-DPAT y 5HT a los 2 DIV durante 24 h disminuye el número de las dendritas primarias pero promueve el crecimiento. A este mismo estadio neuronal, la 5-HT a través de 5HT<sub>1A</sub>-R y 5HT<sub>7</sub>-R aumentó el crecimiento de dendritas secundarias. Por otro lado, se demostró a los 8 DIV que la 5-HT aumenta el número de dendritas primarias más cortas a través de un receptor serotoninérgico desconocido. Adicionalmente, los cambios inducidos por la 5-HT a los 8 DIV, indican que el 5HT<sub>1A</sub>-R promueve una reducción en el largo de las dendritas primarias, fenómeno observado por la reducción en el número de las dendritas primarias más largas (> 40  $\mu$ m); efecto también observado en las secundarias más largas (> 20  $\mu$ m). En apoyo, el análisis de Sholl muestra una disminución de la complejidad neuronal asociada a este receptor. Es decir, el 5HT<sub>1A</sub>-R inhibe el crecimiento y la complejidad dendrítica, probablemente al frenar el crecimiento o elongación de éstas, quedando por establecer los mecanismos moleculares asociados. En apoyo a este hallazgo, se ha descrito recientemente en hipocampo de ratón adulto que el 5HT<sub>1A</sub>-R produce una disminución de las dendritas terciarias. En contraste, a los 8 DIV el 5HT<sub>7</sub>-R promueve un aumento del crecimiento de dendritas primarias y secundarias, siendo este último efecto también observado por la estimulación del 5HT<sub>1A</sub>-R. En resumen, el 5HT<sub>1A</sub>-R promueve una disminución de la complejidad dendrítica, en contraste al efecto positivo de la activación del 5HT<sub>7</sub>-R observado a nivel de las neuritas y dendritas; sugiriendo que estos receptores pueden modular la morfología neuronal de forma diferencial dependiendo de la madurez del cultivo. Además, por primera vez se involucra la participación de los receptores 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>7</sub> sobre la morfología neuronal en cultivo primario de hipocampo de rata. Además, este estudio muestra los efectos de agonistas serotoninérgicos sobre vías transduccionales relacionadas a la modulación del citoesqueleto y cambios en la morfología que depende de la madurez de neuronas hipocampales.

## SUMMARY

### **SEROTONERGIC RECEPTORS AGONISTS PROMOTE TRANSDUCTION PATHWAYS INVOLVED IN CYTOSKELETON REGULATION AND PRODUCE MORPHOLOGICAL CHANGES IN HIPPOCAMPAL CULTURED NEURONS**

Serotonin (5-HT) is a neurotransmitter found early during development of the central nervous system and recently it has been involved in cell migration and neuronal morphology. The pharmacological inhibition of 5-HT synthesis during embryonic development suggests that its reduction produces long-term effects reflected as decreased brain weight, altered neuronal maturation and reduction of dendritic complexity.

The 5-HT exerts its actions through ionotropic (5HT<sub>3</sub>) and metabotropic (5HT<sub>1</sub>, 5HT<sub>2</sub>, 5HT<sub>4</sub>-5HT<sub>7</sub>) receptors. Some of these receptors are expressed early during embryonic development and their distribution or levels can change dynamically during pre-and postnatal development. This thesis focuses on 5HT<sub>1A</sub> and 5HT<sub>7</sub> receptors, which are present in brain structures such as the hippocampus. Interestingly, the 5HT<sub>1A</sub>-R is expressed early during embryonic development, suggesting that 5-HT could have a modulating effect on cell migration, differentiation and viability. In contrast, a dynamics expression of 5HT<sub>7</sub>-R has been described during postnatal development, suggesting a role in well-defined neuronal stages.

Overexpression of 5HT<sub>1A</sub> and 5HT<sub>7</sub> serotonin receptors in cell lines has allowed studying their coupling to several transduction pathways. These receptors are coupled to several G protein allowing the activation or inhibition of effector proteins such as AC, phospholipases, regulation of ion channels and activation of MAPK and PI3K-Akt, among others. These pathways promote neurites and dendrites formation, and have been implicated in the regulation of synaptic plasticity. In contrast, the effectors of these receptors described in cell lines have not been well defined in neurons.

Although some evidences support the idea that 5-HT regulates neuronal morphology, it has not been established which serotonergic receptors are involved. The 5HT<sub>1A</sub>-R activation induces an increase in both the number and length of neurites in mouse neuroblastoma. In relation to these morphological changes, it has been described that Rho GTPases pathway regulates the cytoskeleton through the modulation of cofilin, an important regulator of actin dynamics. Additionally, a link between 5HT<sub>7</sub>-R, activation of Gα12 and the increase of neurite outgrowth in hippocampal neurons has been described, but it has not been elucidated the transduction pathway involved.

According to these evidences, the following hypothesis was proposed: "Agonists of 5HT<sub>1A</sub> and 5HT<sub>7</sub> receptors activate pathways that modulate the cytoskeleton, effects that are associated with morphological changes in cultured hippocampal neurons." The aims were to: 1) Determine, the effect of 5HT<sub>1A</sub>-R and 5HT<sub>7</sub>-R agonist on proteins involved in transduction pathways, targeting microtubule and actin cytoskeleton like Akt-GSK- 3β, ERK and cofilin, respectively, on hippocampal neurons with different maturity. 2) Determine the effect of 5HT<sub>1A</sub>-R and 5HT<sub>7</sub>-R agonist on morphology of hippocampal neurons with different maturity. These objectives were developed using specific antagonists of 5HT<sub>1A</sub> (WAY-100635) and 5HT<sub>7</sub> (SB269970) receptors.

In this thesis it was shown that the distribution of 5HT<sub>1A</sub> receptor undergoes a polarization during the maturity of neurons, being early found in the soma and late with a somato-dendritic distribution but without changes on receptor levels. In contrast, the somato-dendritic distribution of 5HT<sub>7</sub>-R was independent of neuronal maturity. Besides, the isoforms “a” and “b” of 5HT<sub>7</sub>-R were detected without changes in their ratio during days *in vitro* (DIV). Nonetheless, both isoforms increased significantly from 2 to 14 DIV. The 8OH-DPAT, a 5HT<sub>1A</sub> (Ki 10 nM) and 5HT<sub>7</sub> (Ki 52 nM) receptor agonist, promotes the activation of the Akt-GSK-3 $\beta$  pathway at 2 DIV, effect which involves the participation of 5HT<sub>7</sub>-R and probably the 5HT<sub>1A</sub>-R. Additionally, in more mature neurons (7 DIV) stimulation with 8OH-DPAT increased activation of Akt, an effect independent of 5HT<sub>1A</sub> and 5HT<sub>7</sub> receptors. These results suggest that this agonist may activate other receptors, and hence demands a reconsideration of its action as selective 5HT<sub>1A</sub> agonist. Moreover, in spite of Akt activation, no changes were observed in the phosphorylation levels of GSK-3 $\beta$ , suggesting dissociation of both kinases at this stage. Additionally, neither 8OH-DPAT nor 5-HT altered the phosphorylation levels of ERK1/2.

Stimulation for 24 hours with 8OH-DPAT at 2 DIV significantly increased the number of primary neurites, accompanied by an increase in the overall length of neurites; effects which are not related to 5HT<sub>1A</sub> and 5HT<sub>7</sub> receptors. These evidences suggest that 8OH-DPAT targets an unknown receptor whose activation increases the number of neurites without affecting their length. Interestingly, it was observed that stimulation with 8OH-DPAT significantly decreased the inactivating phosphorylation of cofilin in Ser<sup>3</sup>; an effect insensitive to the antagonists of the 5HT<sub>1A</sub> and 5HT<sub>7</sub> receptors. Similarly, a significant decrease of phosphorylated cofilin levels after stimulation with 5-HT was observed at 7 DIV; effect not associated to 5HT<sub>1A</sub> and 5HT<sub>7</sub> receptors, suggesting the participation of an unknown serotonin receptor modulating actin dynamics.

Additionally, the 5HT<sub>7</sub>-R activation with 8OH-DPAT and 5-HT at 2 DIV during 24 h decreases the number of primary dendrites but promotes its growth. At this neuronal stage, 5-HT stimulates secondary dendrite growth through both 5HT<sub>1A</sub>-R and 5HT<sub>7</sub>-R. Furthermore, this thesis demonstrated at 8 DIV that 5-HT increases the number of short primary dendrites via an unknown serotonergic receptor. Additionally, the changes induced by 5-HT at 8 DIV, indicate that 5HT<sub>1A</sub>-R promotes a reduction in the length of the primary dendrites, a phenomenon observed as reduction in the number of longer primary dendrites (> 40  $\mu$ m); effect also observed in longer secondary dendrites (> 20  $\mu$ m). In accordance, Sholl analysis shows a decrease in neuronal complexity associated with this receptor. Thus, 5HT<sub>1A</sub>-R inhibits primary dendritic growth and complexity, probably by slowing the growth or elongation, and the molecular mechanisms associated remains to be explained. In support of this finding, it has been recently described in adult mouse hippocampus, that 5HT<sub>1A</sub>-R promotes a decrease of tertiary dendrites. In contrast, this Thesis described that 5HT<sub>7</sub>-R induces an increased growth of primary and secondary dendrites at 8 DIV; being the latter effect also observed by 5HT<sub>1A</sub>-R stimulation. To summarize, the 5HT<sub>1A</sub> promotes a reduction of dendritic complexity in contrast to the positive effect of 5HT<sub>7</sub> receptors observed in both neurites and dendrites; suggesting that these receptors differentially modulate the neuronal morphology depending on neuron maturity. Furthermore, we described for first time the participation of 5HT<sub>1A</sub> and 5HT<sub>7</sub> on neuronal morphology in primary culture of rat hippocampal neurons. Additionally this study shows the effects of serotonergic agonists on transduction pathways related to cytoskeleton modulation and morphological changes depending on maturity of hippocampal neurons.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los neurotransmisores ejercen una variedad de acciones complejas sobre sus células blanco a través de la activación de receptores específicos. Estas acciones incluyen cambios en la excitabilidad celular, expresión génica, activación de vías neuroprotectoras y modificaciones en la morfología celular entre otras. Más aún diversas evidencias sustentan la idea de que los neurotransmisores regulan varios aspectos del desarrollo del sistema nervioso central (SNC). En apoyo a esto, se ha demostrado que varios neurotransmisores son detectados tempranamente durante el desarrollo ó en un período particular del desarrollo (Lauder 1993).

La serotonina (5-HT) es un mediador químico que se ha mantenido durante la evolución y se sintetiza a partir del triptófano (Figura 1). En organismos inferiores como la *Aplysia*, este neurotransmisor se detecta tempranamente durante el desarrollo del sistema nervioso y en etapa adulta se asocia a neuronas del sistema nervioso e intestino (Goldstein y cols., 1984). En este modelo, extensivamente utilizado para caracterizar mecanismos de plasticidad sináptica, se demostró que la estimulación de las neuronas sensoriales con pulsos de 5-HT produce cambios morfológicos a través del incremento en el número de varicosidades; fenómeno que da cuenta de un aumento de la eficacia sináptica (Udo y cols., 2005). El cambio morfológico dependiente de la 5-HT está asociado a un aumento en la actividad de la PI3K y de la fosfolipasa C (PLC); enzimas que promueven la formación de filopodios mediante la activación de la proteína G pequeña, ApCdc42 (Udo y cols., 2005).

En mamíferos, además de su papel como neurotransmisor, se ha sugerido que la serotonina regula la conectividad neuronal durante el desarrollo a través de la modulación de la migración celular y la citoarquitectura (Lauder 1993). Esto adquiere especial relevancia puesto que los niveles de 5-HT pueden modificarse durante el desarrollo por una serie de factores ambientales que impactan a las hembras preñadas, como por ejemplo cambios en la nutrición (triptófano) (Serfaty y cols., 2008), desafíos a agentes estresantes (Papaioannou y cols., 2002), infecciones (Winter y cols., 2009), y a su vez por fármacos que modulan los

niveles de 5-HT en el espacio sináptico como los inhibidores selectivos recaptación de serotonina (ISRS) (Xu y cols., 2004) entre otros. De esta forma, alteraciones en neurocircuitos observados en el adulto pueden relacionarse a disfunciones en las acciones de la 5-HT durante etapas claves en el desarrollo, las cuales pueden predisponer a un individuo en etapa juvenil y adulto a diversas neuropatologías (Hornung 2003).

Las neuronas que sintetizan 5-HT están localizadas en una zona restringida del tronco encefálico. La porción más caudal representada por los núcleos B1-B5 corresponden a los núcleos del rafe pallidus, magnus, obscuro y pontis, y la porción más rostral, B6-B9 corresponde al rafe dorsal y medial. También se ha descrito que el número total de neuronas serotoninérgicas son aproximadamente 20.000 en la rata en comparación al total de neuronas  $10^{10}$  (Jacobs y cols., 1992). Tanto en roedores como en humanos, se ha observado que las neuronas serotoninérgicas concluyen la mitosis mucho antes que otros fenotipos neuronales. En roedores esto ocurre entre los días 12 y 14 de gestación (Jacobs y cols., 1992), mientras que en el humano se observa aproximadamente entre la 5 y 12 semana de gestación (Herlenius y cols., 2004).

En la rata, las primeras neuronas inmuno-reactivas a 5-HT se observan en el día E13 y son parte del grupo B4-B9 y las del grupo B1-B3, se detectan aproximadamente en E14 (Wallace y cols., 1983). La diferenciación relativamente temprana de las neuronas serotoninérgicas sugiere un rol modulador de la 5-HT sobre los otros sistemas de neurotransmisores durante el desarrollo. Adicionalmente, se ha descrito que las fibras serotoninérgicas del tronco encefálico son las primeras en inervar a la medula espinal y el cerebro anterior (Lidov y cols., 1982); estableciéndose que la inervación hacia la corteza cerebral ocurre en el día 17 de gestación de la rata; justamente antes de que se comience a desarrollar su estructura laminar (Wallace y cols., 1983).

Más recientemente, se ha descrito el papel de la 5-HT sobre la migración y morfología neuronal. La inhibición farmacológica de la síntesis de 5-HT mediante la administración diaria de p-clorofenilalanina (PCA) a ratas preñadas entre E12-E17, es decir en un período

crítico para la formación de la corteza donde ocurre neurogénesis y migración neuronal, produce una reducción significativa de los niveles de 5-HT en los fetos de E12-E17 (Vitalis y cols., 2007). Más aún, el peso del cerebro es menor que los controles entre los días p15-p90; sugiriendo que la inhibición de la síntesis de 5-HT durante el desarrollo embrionario produce efectos a largo plazo (Vitalis y cols., 2007). Adicionalmente, se observa una alteración en la maduración de las neuronas de la capa III y V de la corteza somato sensorial asociado a una reducción en la complejidad dendrítica observada en P0 y P8 (Vitalis y cols., 2007). Mas aún, estos efectos no se relacionan a cambios en los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Vitalis y cols., 2007).

Con la idea de determinar el efecto de la 5-HT producida centralmente, se ha obtenido un knock-out para la enzima triptófano-hidroxilasa 2 (*Tph2*, NCBI: proteína, NP\_775567.2; gene ID, 216343). Esta enzima es la encargada de hidroxilar en posición 5 al triptófano, el cual al ser descarboxilado por la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos se genera la 5-HT. La TPH2 está presente en los núcleos del rafe y es la responsable de la síntesis de 5-HT en el cerebro (Walther y cols., 2003). Los animales *Tph2*<sup>-/-</sup> presentan un crecimiento lento y a la vez poseen neuronas en los núcleos de rafe con características electrofisiológicas de neuronas serotoninérgicas (Gutknecht y cols., 2012). Los autores concluyen que el déficit de la 5-HT durante el desarrollo no sería necesaria para la diferenciación de las neuronas serotoninérgicas (Gutknecht y cols., 2012). Sin embargo, se observó que la deficiencia de 5-HT induce una regulación hacia arriba de los receptores 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>1B</sub> en el cerebro y una reducción en el contenido de noradrenalina posiblemente debido a una disminución en el número de neuronas noradrenérgicas (Gutknecht y cols., 2012). Estos estudios sugieren que la reducción en la producción de 5-HT en el cerebro podría afectar el desarrollo de las neuronas noradrenérgicas. Sin embargo se podría plantear que los animales *Tph2*<sup>-/-</sup> durante el desarrollo embrionario, podrían estar expuestos al aporte de 5-HT proveniente de la madre lo que podría ser suficiente para ejercer un rol trófico durante la etapa fetal. En relación a esto, se ha determinado que un aumento en los niveles de 5-HT periférica se correlaciona con un aumento en el cerebro, lo que apoya la idea de que puede cruzar la barrera

hematoencefálica (Nakatani y cols., 2008). Por otra parte, crías obtenidas de ratones knock-out para la *Tph1*, enzima encargada de la síntesis de 5-HT periférica, presentan alteraciones en el desarrollo del cerebro, lo que ha sugerido que el aporte materno de 5-HT controla la morfogénesis durante estados del desarrollo que preceden la aparición de las neuronas serotoninérgicas fetales (Cote y cols., 2007). Más aún, una evidencia reciente señala que la placenta es otra fuente de síntesis de 5-HT (Bonnin y cols., 2011).

Se ha demostrado en cerebro adulto que la reducción de los niveles de 5-HT lograda por la administración por 4 días de PCA produce una reducción en las sinápsis monoaminérgicas (Chen y cols., 1994) y en la densidad sináptica en la capa molecular del giro dentado (GD) (Wilson y cols., 1998). Estos cambios se acompañan por una reducción en los niveles de S100 $\beta$  (Azmitia y cols., 1992) y a su vez en los niveles de sinaptofisina y MAP2A (Azmitia y cols., 1995; Whitaker-Azmitia y cols., 1995) marcadores de sinapsis y de dendritas respectivamente. En resumen, estos antecedentes sugieren que una reducción de los niveles de 5-HT en el cerebro adulto produce una regresión hacia un estado inmaduro.

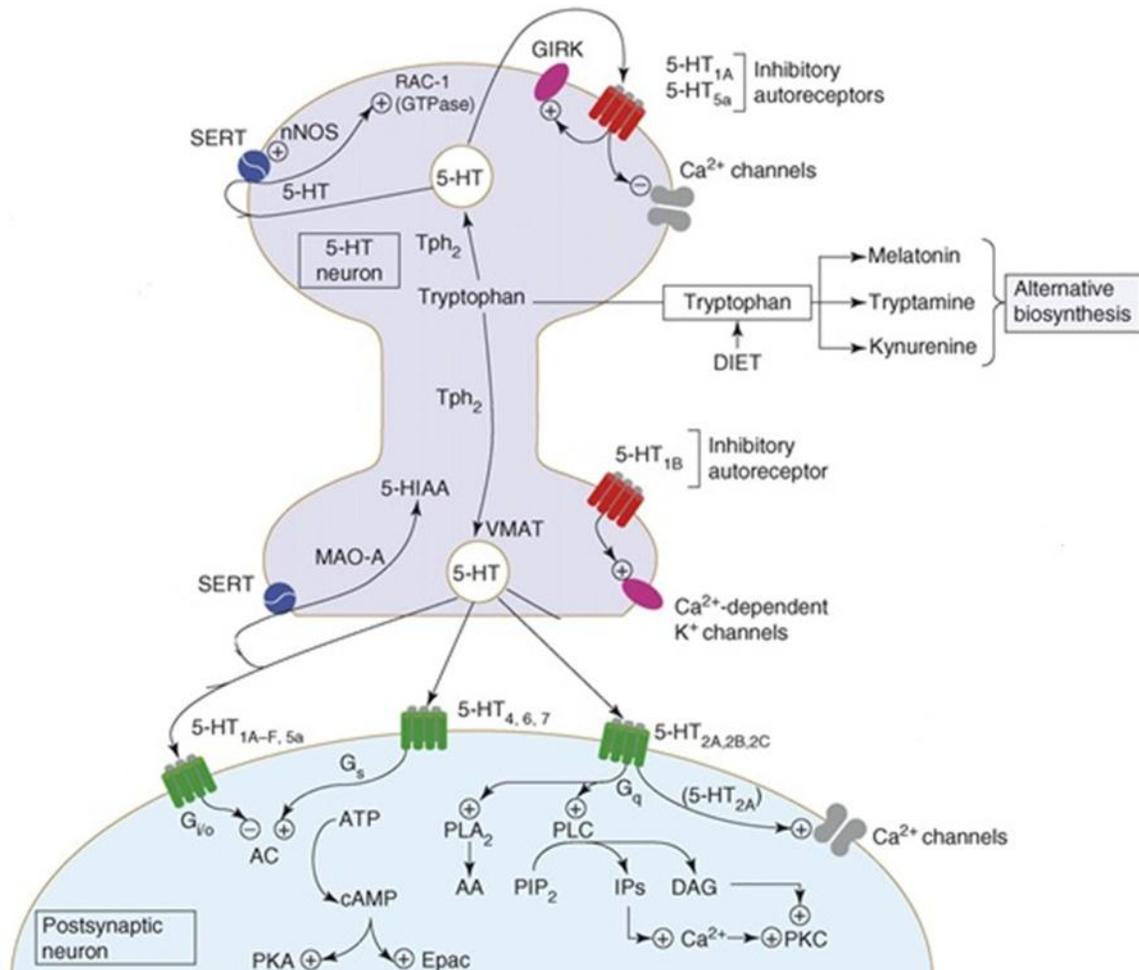
De acuerdo a estas evidencias, la 5-HT puede ser considerada como un factor diferenciador durante etapas tempranas del desarrollo de sistema nervioso y que probablemente además de sus acciones como neurotransmisor ejerce adicionalmente una acción trófica en el cerebro adulto.

### 1.1 Receptores serotoninérgicos durante el desarrollo

Los receptores serotoninérgicos se han clasificado en 7 familias y la mayoría de éstos corresponden a receptores acoplados a proteína G (Figura 1) que regulan positiva o negativamente la adenilato ciclasa (AC); o bien permiten la activación de la PLC, resultando en la producción de IP<sub>3</sub> y diacilglicerol (DAG) (Mattson y cols., 2004). Se han descrito 15 genes para los receptores de serotonina, clasificados como 5HT<sub>1A-F</sub>, 5HT<sub>2A-C</sub>; 5HT<sub>3</sub>, 5HT<sub>4</sub>, 5HT<sub>5</sub>, 5HT<sub>6</sub>, y 5HT<sub>7</sub>. A diferencia del receptor 5HT<sub>3</sub> que es ionotrópico

(Mattson y cols., 2004), el resto de los receptores están acoplados a distintos tipos de proteínas G $\alpha$  como por ejemplo el 5HT<sub>1</sub> se asocia a  $\alpha_i/\alpha_o$ , el 5HT<sub>2</sub> a  $\alpha_q$  y los subtipos 5HT<sub>4</sub>, 5HT<sub>5</sub>, 5HT<sub>6</sub> y 5HT<sub>7</sub> a  $\alpha_s$  (Albert y cols., 2001) (Figura 1 y Tabla 1). Además, tanto el procesamiento alternativo o el *editing* de los transcritos generan a lo menos 20 receptores de 5-HT adicionales con diferentes afinidades y funciones fisiológicas (Mattson y cols., 2004). La función de estos receptores se relaciona a una plétora de acciones fisiológicas y patológicas entre los que se destaca la ansiedad, la depresión, la anorexia y esquizofrenia, entre otras (Tabla 1).

Dada la diversidad de receptores a serotonina es que ha sido dificultoso precisar el rol de cada receptor o en combinación con otros sobre el desarrollo del cerebro. Más aún, estudios inmunohistoquímicos indican que miembros de cada familia de receptores están expresados tempranamente durante el desarrollo embrionario y son regulados dinámicamente durante el desarrollo pre y posnatal. Existen diversas revisiones de la literatura que involucran a los receptores serotoninérgicos en diversos procesos con énfasis en el probable uso terapéutico (Tabla 1). Esta aproximación se ha realizado en base a estudios farmacológicos y a la vez mediante la generación de animales knock-out para cada uno de los subtipos de éstos receptores.



**Figura 1. Mirada integral de la señalización de la neurona serotoninérgica.** La serotonina se sintetiza desde el triptófano por acción de la triptófano-hidroxilasa 2 (Tph<sub>2</sub>) y es metabolizada por la monoamino oxidasa (MAO) A luego de la liberación y recaptación a través del transportador de serotonina (SERT). Los receptores serotoninérgicos se localizan pre y post-sinápticamente en la neurona serotoninérgica. Los autorreceptores 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>1B</sub>, se localizan sobre el cuerpo celular y terminales respectivamente, además el autorreceptor 5HT<sub>5a</sub> también puede localizarse de esta forma. La mayoría de los tipos de transducción se muestra a nivel post-sináptico y muchos de los receptores convergen sobre vías de señalización específicas. Adaptado de Millan (Millan y cols., 2008).

**Tabla 1. Receptores serotoninérgicos en el cerebro humano: Transducción, distribución, funciones putativas, y patologías relacionadas**

Receptor 5-HT	Sistema de transducción	Región del cerebro humano	Función Putativa	Interés clínico relacionado
5HT <sub>1A</sub>	GPCR ↑↓AMPC, Proteína G acoplado a corriente de K <sup>+</sup>	Núcleo del Rafe, hip, hipo, Ami, Cx, CPU, Fcx	Neurotransmisión serotoninérgica Termorregulación, alimentación, estrés, dolor, estado del ánimo, emoción, cognición, aprendizaje, memoria	Ansiedad/depresión Desórdenes neurodegenerativos Esquizofrenia
5HT <sub>1B</sub>	GPCR ↓AMPC	SN/ATV, NAC, CPU, palidum ventral, Cx	Neurotransmisión serotoninérgica, estado del ánimo, alimentación	Ansiedad/depresión migraña
5HT <sub>1D</sub>	GPCR ↓AMPC	CPu, palidum ventral, Fcx	Neurotransmisión serotoninérgica, estado del ánimo, alimentación	Ansiedad/depresión migraña
5HT <sub>1E</sub>	GPCR ↓AMPC	Cpu, hipo, Cx	(¿?)	(¿?)
5HT <sub>1F</sub>	GPCR ↓AMPC	Ce, Hip, Cx	Estado del ánimo, emoción	Migraña
5HT <sub>2A</sub>	GPCR ↑PLC	Complejo dorsal vagal, Tal, CPU, Cx, Fcx	Estado del ánimo, control respiratorio, alimentación, nocicepción	Depresión, síndrome de Tourette's, enfermedad de alzheimer, anorexia, bulimia, droga de abuso, dolor
5HT <sub>2B</sub>	GPCR ↑PLC	Ce?, LS?, Hipo?, Cx?	Desarrollo del cerebro? Alimentación?	Droga de abuso Ansiedad?
5HT <sub>2C</sub>	GPCR ↑PLC	Plexus coroideo, ce, NDR, SN, Hipo, Ami, Hip, CPU, NAC, Cx	Estado del ánimo, impulsividad, alimentación, actividad locomotora	Ansiedad/depresión, esquizofrenia, droga de abuso, obesidad
5HT <sub>3</sub>	Conductancia de iones (K <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> , Ca <sup>+2</sup> )	Complejo dorsal vagal, Hip, Ami, CPU	Reflejo del vómito, estado del ánimo	Nausea, Ansiedad/depresión
5HT <sub>4</sub>	GPCR ↑AMPC	Hipo, Hip, NAC, CPU	Alimentación, recompensa, cognición	Anorexia, droga de abuso, enfermedad de alzheimer
5HT <sub>5A</sub>	GPCR ↑AMPC	Ce, Hipo, Tal, Hip, Cx	Ritmo circadiano, sueño, estado del ánimo, cognición	Esquizofrenia? Ansiedad/depresión?
5HT <sub>6</sub>	GPCR ↑AMPC	Hip, CPU, Cx, tuberculo olfatorio	Cognición, aprendizaje memoria, alimentación	Enfermedad de alzheimer, demencia, obesidad
5HT <sub>7</sub>	GPCR ↑AMPC	Núcleo del Rafe, Hipo, Tal, Hip, Ami, Cx	Estado del ánimo, sueño, cognición, dolor, migraña	Ansiedad/depresión, esquizofrenia

NAC: Núcleo accumbens; Ami: amígdala; Ce: cerebelo; CPU: caudado-putamen; Cx: corteza; NRD: núcleo del rafe dorsal; Fcx: corteza frontal; Hip: hipocampo; hipo: hipotálamo; SL: septum lateral; SN, sustancia nigra; Tal: tálamo; ATV: área tegmental ventral. Adaptado de Charnay (Charnay y cols., 2010) y Dutton (Dutton y cols., 2008).

## 1.2 Cascadas transduccionales relacionadas a la activación de receptores serotoninérgicos

El énfasis de esta Tesis ha sido en torno a la relación entre la activación de receptores serotoninérgicos y cambios morfológicos que estos pueden producir especialmente en neuronas. De acuerdo a esto, sólo se describirán algunos de los receptores serotoninérgicos que tienen relevancia en etapas del desarrollo del sistema nervioso y que al parecer inducen cambios morfológicos en distintos tipos celulares.

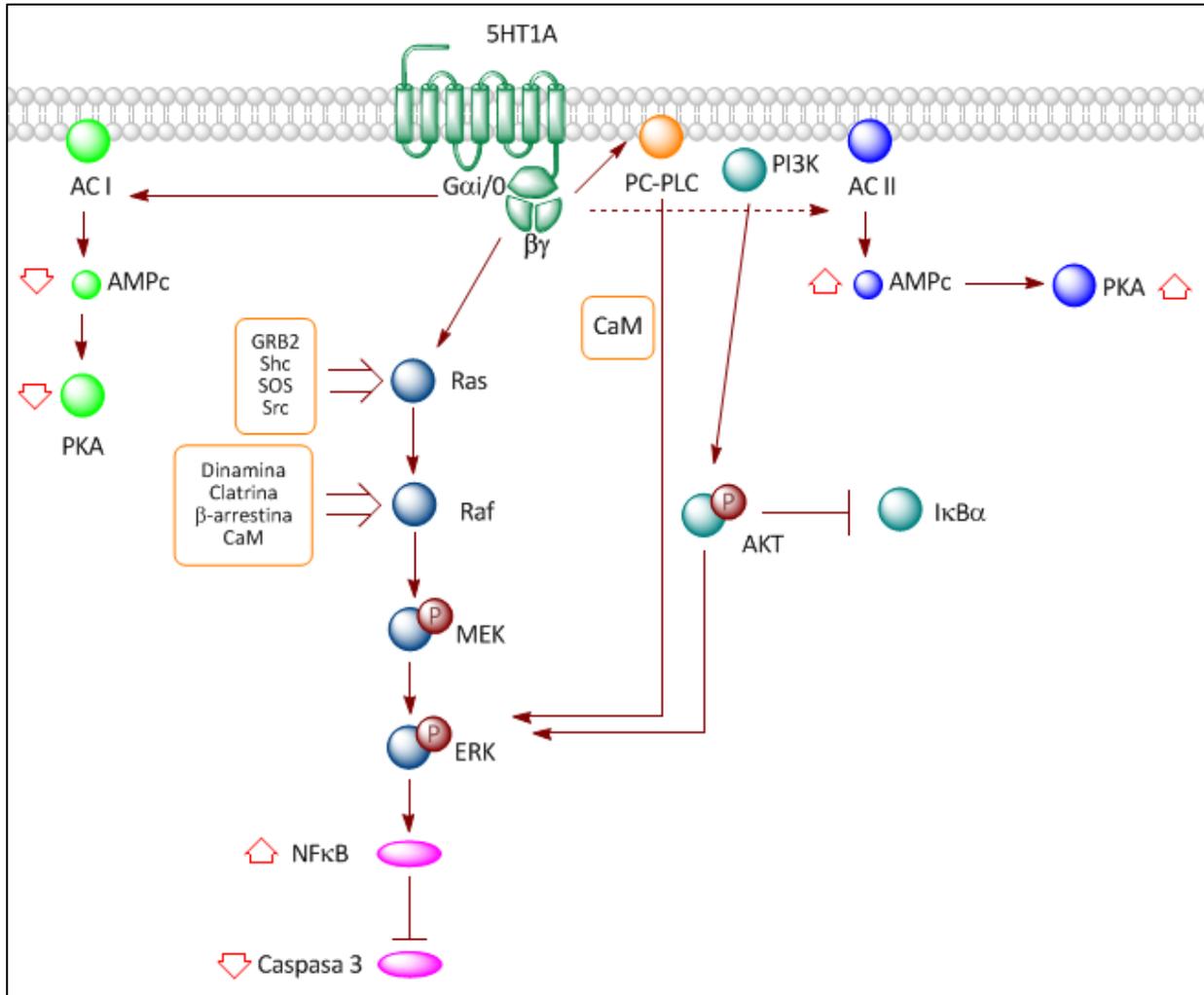
Se ha demostrado que el transcrito del 5HT<sub>1A</sub>-R se detecta en el cerebro fetal de roedores en el estadio E12, llegando a un nivel máximo en E15 para disminuir progresivamente a niveles muy bajos justo previo al nacimiento (E20) (Hillion y cols., 1993). La expresión temprana es principalmente a nivel del rafe y del hipocampo y está transitoriamente expresado en neuronas motoras y del cerebelo después del nacimiento (Miquel y cols., 1994). Estudios *in vivo* han mostrado que la activación de los 5HT<sub>1A</sub>-R estimula la proliferación de células progenitoras a nivel del hipocampo y la zona subventricular (Yan y cols., 1997; Brezun y cols., 1999). Sin embargo, no se ha establecido si los progenitores expresan este receptor o si el 5HT<sub>1A</sub>-R ejercen un efecto trófico indirecto a través de la participación de células gliales (Azmitia 2001).

El 5HT<sub>1A</sub>-R ha sido involucrado en la activación de vías canónicas asociadas a la activación de receptores tipo tirosina quinasas (RTK) (Figura 2). La utilización de líneas celulares transfectadas con el 5HT<sub>1A</sub>-R ha permitido dilucidar su participación sobre la activación de distintas cascadas transduccionales a través del acoplamiento a diversas proteínas G que permiten la activación de proteínas efectoras como AC, fosfolipasas, regulación de canales iónicos y activación de las vías MAPK y PI3K-Akt. Se ha demostrado en distintas líneas celulares (HEK293, HeLA, COS-7) que el 5HT<sub>1A</sub>-R al ser sobre-expresado media una señalización a través de su acoplamiento a proteínas G $\alpha$ i/G $\beta$ , a través de una disminución de los niveles de AMPc, reducción en la actividad de la PKA y una activación de canales de K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> (ver Figura 2) (Fargin y cols., 1989; Cowen y cols., 1996; Garnovskaya y cols., 1996). Existen antecedentes que indican que en el núcleo dorsal del rafe, los auto receptores

5HT<sub>1A</sub> se acoplan principalmente a G $\alpha$ 3 regulando la activación de canales de potasio (GIRK) y por ende disminuyendo la excitabilidad celular; en cambio los heteroreceptores 5HT<sub>1A</sub> presentes en estructuras como el hipocampo, se acoplan principalmente a G $\alpha$ 0 regulando al GIRK y activando a la AC tipo II (Mannoury la Cour y cols., 2006) (Figura 2).

La vía Ras-Raf-MAPK regula importantes procesos celulares y también participa promoviendo la formación de dendritas (Kumar y cols., 2005). Por otro lado, la vía Ras-PI3K-Akt ha sido involucrada con la regulación de la plasticidad sináptica y formación de la memoria. Kumar y cols. en el año 2005, mediante la expresión de mutantes constitutivamente activas de Ras en neuronas de hipocampo de rata (P1-P2) a los 15 DIV, observaron un incremento en el largo de ramificaciones dendríticas, puntos de términos y tamaño del soma. Mediante un inhibidor farmacológico de la MEK (U0126), proteína blanco de las MAPK y LY294002 un inhibidor de la PI3K, observaron la inhibición de los efectos provocados por el mutante activo de Ras. Interesantemente, el incremento del tamaño en el soma fue bloqueado solo por el LY294002 y no por U0126. Estos autores concluyen que ambas vías regulan cooperativamente el desarrollo de las dendritas y que la vía Ras-Raf-MAPK incrementa su complejidad (Kumar y cols., 2005).

Estudios desde hace más de dos décadas, asoció la activación de las vías Ras-Raf-MAPK y PI3K-Akt en células transfectadas con el 5HT<sub>1A</sub>-R. Es así que el estímulo con agonistas serotoninérgicos promueven la activación de las ERK, efecto prevenido tanto por la utilización de antagonistas específicos del receptor como por el pre-tratamiento con toxina pertussis; demostrando que la activación de las ERK depende de una Gi o G $\alpha$ 0. Más aún, se ha demostrado que el tratamiento con secuestradores de calcio intracelular, inhibidores de la PI3K y de la PLC específica para fosfatidilcolina (PC-PLC), produce una disminución de la activación de la ERK promovida por agonistas serotoninérgicos. Interesantemente, se ha involucrado la participación del complejo  $\beta\gamma$  en la activación de la ERK, tras la



**Figura 2. Vías transduccionales asociadas a la activación del receptor serotoninérgico 5HT<sub>1A</sub> sobre-expresado en líneas celulares no neuronales.** Se muestran las vías de señalización para el 5HT<sub>1A</sub>-R descritas en células CHO (células derivadas de ovario de hámster chino) y HEK293 (células embrionarias humanas de riñón). La activación del receptor reduce los niveles de AMPc a través de la inhibición de la ACI, con la consecuente disminución en la actividad de la PKA; efecto mediado por Gα<sub>i/0</sub>. En contraste, la co-expresión del receptor con la ACII, promueve un aumento de la actividad de esta enzima, incrementando los niveles de AMPc y activación de la PKA; efecto mediado por βγ. La liberación de βγ tras la activación del receptor, promueve la fosforilación de la ERK mediante dos vías donde participan las proteínas Ras-Raf-MEK y PC-PLC. Además, el aumento de la fosforilación de la ERK tras la activación del receptor promueve una disminución de la actividad de la Caspasa3; efecto mediado por la activación del factor transcripcional NFκB. Adicionalmente, se observa que mediante la activación de receptor, la vía PI3K-Akt participa en la fosforilación de la ERK.

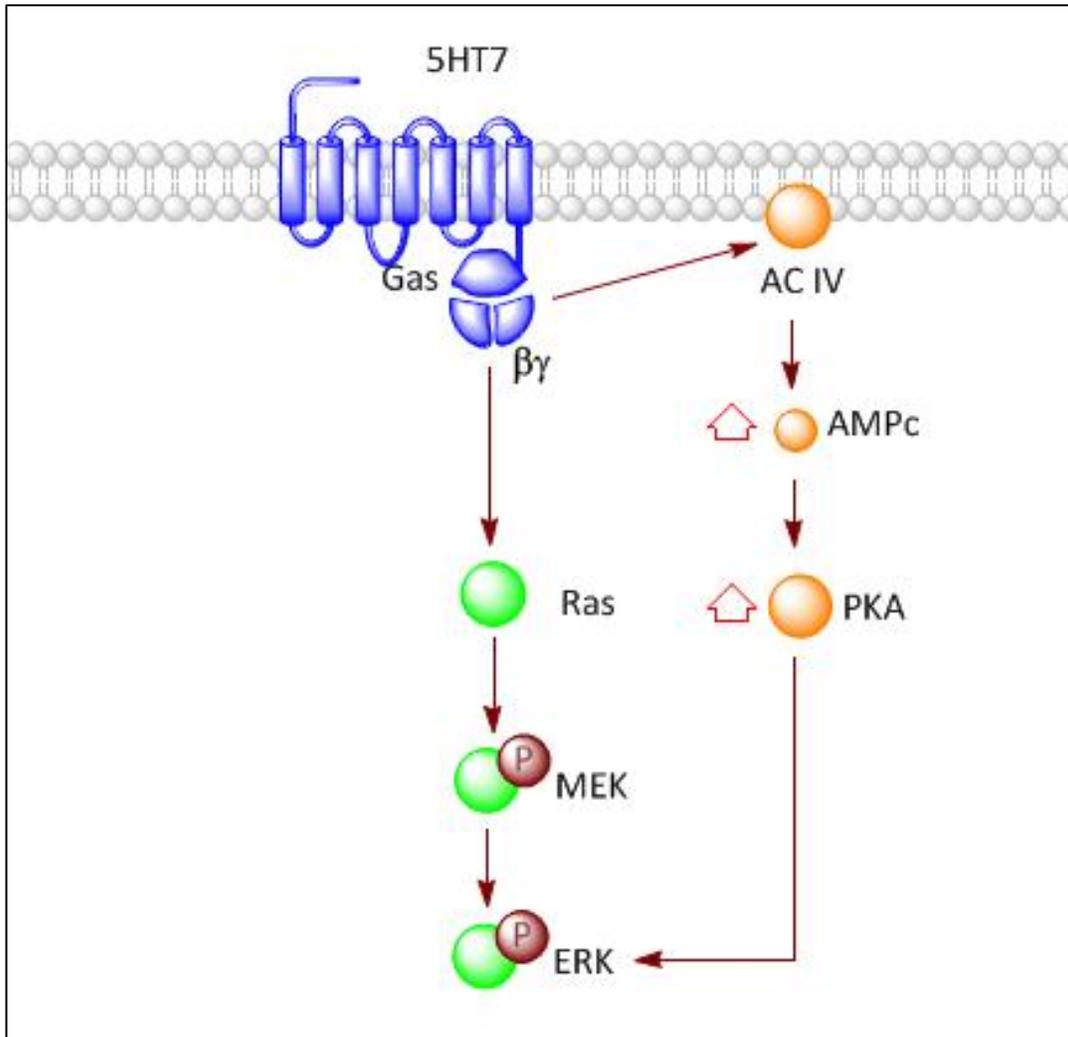
estimulación del 5HT<sub>1A</sub>-R demostrado a través de un miniconstruido que actúa como secuestrador de las subunidades  $\beta\gamma$  (Garnovskaya y cols., 1996) (Figura 2).

En cultivos primarios de hipocampo (fetos E18), la estimulación con agonistas 5HT<sub>1A</sub>-R activa la vía PI3K-Akt (PKB), pero no la de las ERK (Cowen y cols., 2005). Se ha determinado *in vivo* que el aumento en los niveles de 5-HT con fenfluramina induce la fosforilación en Ser<sup>9</sup> de la GSK-3 $\beta$  y reduciendo su actividad; efecto dependiente de la activación del 5HT<sub>1A</sub>-R (Li y cols., 2004). En contraste se ha determinado, que agonistas del 5HT<sub>2A</sub>-R reducirían la activación de la vía Akt (Li y cols., 2004), con la consecuente reducción en el estado de fosforilación de la GSK-3 $\beta$  y por ende induciendo su activación. Hay que destacar que varias cascadas de señalización activan a quinasas como la PKA, PKB, PKC, RSK que convergen sobre la GSK-3 $\beta$  reduciendo su actividad (Eldar-Finkelman 2002). La GSK-3 $\beta$  regula a múltiple factores de transcripción y consecuentemente la expresión de distintos genes, contribuyendo a la regulación de la apoptosis y la supervivencia celular. Además, la actividad de GSK-3 $\beta$  participa en la citoarquitectura (Frame y cols., 2001; Grimes y cols., 2001) puesto que inactiva a proteínas que interactúan con el citoesqueleto de actina y tubulina como la  $\beta$ -catenina, MAP1 y CRMP2 (Hur y cols., 2010).

El receptor serotoninérgico 5HT<sub>7</sub> (5HT<sub>7</sub>-R) ha sido recientemente clonado. Mediante análisis de inmunorreactividad se ha determinado la expresión de este receptor en estadios tempranos posnatal (P2-P6), expresión que disminuye en períodos de mayor desarrollo (Kobe y cols., 2012). Acoplado a la proteína Gs estimula la actividad de la AC (Shen y cols., 1993) y se le han atribuido distintas funciones como su papel en el control del ritmo circadiano, sueño, procesos cognitivos, dolor y migraña así como en la fisiopatología de desórdenes psiquiátricos como la depresión (Hedlund y cols., 2004) (Tabla 1). Se ha sugerido que la modulación del 5HT<sub>7</sub>-R produce efectos antidepresivos independientes de cambios de la transmisión sináptica.

Al igual que para el 5HT<sub>1A</sub>-R, la sobre-expresión en líneas celulares (HEK293, PC12) y el estudio en neuronas, ha permitido determinar los efectores que participan tras la activación del 5HT<sub>7</sub>-R. El estímulo con agonistas serotoninérgicos en líneas celulares que sobre expresan el receptor, promueve un aumento de los niveles de la ERK-p, efecto dependiente de la participación de PKA (Lin y cols., 2003), Ras y MEK e independiente de RAP (Figura 3) (Norum y cols., 2003). Además en la línea celular PC12 transfectada con el receptor, se ha demostrado que la estimulación con un agonista del 5HT<sub>7</sub>-R, induce un incremento de Ca<sup>2+</sup> citosólico que conlleva a una disminución de los niveles de ERK-p, efecto no observado en neuronas hipocampales (Lin y cols., 2003). Se ha descrito que el estímulo con un agonista serotoninérgico no solo promueve un aumento de los niveles de ERK-p sino también de Akt-p, efecto dependiente de la PI3K, Ca<sup>2+</sup> y AMPc (Johnson-Farley y cols., 2005).

En células de cultivos primarios hipocampales maduros (12-16 DIV), se ha observado que el estímulo con un agonista serotoninérgico aumenta los niveles de ERK-p (Errico y cols., 2001). Sin embargo hasta la fecha no se ha reportado una asociación entre el 5HT<sub>7</sub>-R y la vía PI3K-Akt.



**Figura 3. Vías transduccionales asociadas a la activación del receptor serotoninérgico 5HT<sub>7</sub> sobre-expresado en líneas celulares no neuronales.** Se muestran las vías de señalización para el 5HT<sub>7</sub>-R descritas en células HEK293. El estímulo del receptor promueve, a través de  $\beta\gamma$ , un aumento en la actividad de la ACIV lo que conlleva a un incremento de los niveles de AMPc y activación de PKA, la que a su vez estimula a la ERK. Por otro lado,  $\beta\gamma$  promueve un aumento de la fosforilación de la ERK, a través de la activación de las proteínas Ras y MEK.

### 1.3 Receptores serotoninérgicos y cambios en la morfología neuronal

La 5-HT induce la diferenciación en cultivo de las células gliales al promover cambios morfológicos de célula madura e induciendo la secreción de la proteína S100 $\beta$ , la cual posee un sin número de funciones entre ellas promover la extensión de neuritas (Whitaker-Azmitia y cols., 1990).

Se ha reportado una disminución en la arborización dendrítica en animales mantenidos con una dieta baja en triptófano (Gonzalez-Burgos y cols., 1996). A su vez, se ha demostrado que la depleción de serotonina mediante la administración de PCA en un período posnatal temprano (P3) produce una reducción en el largo dendrítico y la densidad de espinas de las neuronas granulares del hipocampo (Yan y cols., 1997). Estos efectos pueden ser prevenidos tras la administración de agonistas del 5HT<sub>1A</sub>-R (Yan y cols., 1997), por lo cual se le adscribe a este receptor un rol fundamental en la morfología hipocampal.

Sin embargo, hasta la fecha no se ha dilucidado la relación entre receptores serotoninérgicos y regulación de la morfología neuronal. En el estudio realizado en línea celular de neuroblastoma de ratón, que expresan endógenamente el 5HT<sub>1A</sub>-R, el estímulo con agonistas serotoninérgico promovió un aumento en el número y largo de neuritas, efecto bloqueado por un antagonista específico del receptor. Interesantemente, la sobre- expresión del 5HT<sub>1A</sub>-R en estas células, provocó un aumento de neuritas en ausencia del agonista, sugiriendo un activación constitutiva del receptor suficiente para inducir cambios morfológicos (Fricker y cols., 2005). Por otro lado, el estudio de Ferreira y cols., en el año 20010 mostró que el estímulo con 5-HT en células hipocampales de ratón, produce una disminución en el número de dendritas terciarias (Ferreira y cols., 2010). Estos antecedentes en conjunto sugieren la participación del 5HT<sub>1A</sub>-R en la regulación de la morfología neuronal.

La aplicación de 5-HT a neuronas sensoriales de la Aplysia provocan aumentos en los terminales axonales (Daubert y cols., 2010), indicando que este neurotransmisor puede

provocar cambios a través de cascadas que involucran remodelamiento del citoesqueleto. Por otra parte, el 5HT<sub>1B</sub>-R está localizado fundamentalmente en los axones y se ha sugerido que estos receptores mediarían la inhibición de la ramificación de los axones de tálamo-corticales que forman parte de la vía visual (Upton y cols., 2002).

En neuronas hipocampales de ratón la activación de 5HT<sub>7</sub>-R endógenos aumenta significativamente el largo de las neuritas (Kvachnina y cols., 2005). Estos antecedentes sugieren que el 5HT<sub>7</sub>-R regula la citoarquitectura neuronal (Nandam y cols., 2007).

Por otro lado, existen antecedentes de otros receptores serotoninérgicos y regulación de la morfología. Es así que el acoplamiento entre el receptor 5-HT<sub>4</sub> (5HT<sub>4</sub>-R), la proteína Gα13 (Kvachnina y cols., 2005), y la activación de RhoA promueve la retracción de las neuritas en células de neuroblastoma (NIE-115) (Kvachnina y cols., 2005). Concordante con este hallazgo, la Gα12 y Gα13 (Strathmann y cols., 1991) participan en la formación de fibras de estrés en células de fibroblasto de ratón (3T3) (Buhl y cols., 1995) y en células PC12 promueven la retracción de neuritas (Kato y cols., 1998). Las proteínas Rho GTPasas son efectores de la señalización de Gα12, y mediante el acoplamiento a proteínas efectoras como LIMK y cofilina, regulan la polimerización de la actina (Arber y cols., 1998; Hall 1998; Yang y cols., 1998) rol importante en la regulación del citoesqueleto neuronal. La estimulación a través de agonistas selectivos de los receptores 5HT<sub>4</sub> y 5HT<sub>7</sub> en neuronas hipocampales, resulta en distintos cambios morfológicos. Así, la estimulación del 5HT<sub>4</sub>-R disminuye el largo y número de neuritas; mientras que agonistas del 5HT<sub>7</sub>-R provoca su extensión. Se ha observado un alto grado de localización entre 5HT<sub>4</sub>-R/Gα13 y 5HT<sub>7</sub>-R/Gα12; sugiriendo una base molecular para las acciones diferenciales de la 5-HT sobre la morfología celular (Kvachnina y cols., 2005). Sin embargo, los eventos moleculares asociados a estos cambios morfológicos aún no han sido precisados.

De acuerdo a lo anterior, resulta clave determinar si la serotonina promueve cambios morfológicos dependiendo de los subtipos de receptores involucrados y su relación a ciertas cascadas transduccionales.

*De todos los antecedentes presentados, aquellos más relevantes son:*

- La 5-HT es un neurotransmisor que se expresa en etapas tempranas en el desarrollo del SNC.
- La 5-HT regula importantes fenómenos neuronales tales como, conectividad neuronal durante el desarrollo, migración celular y la citoarquitectura.
- La disminución de 5-HT mediante estrategias farmacológicas durante el desarrollo embrionario produce efectos a largo plazo, como disminución del peso del cerebro de fetos y disminución de la complejidad dendrítica. En cerebro adulto produce una disminución de la sinápsis monoaminérgica y densidad sináptica en la capa molecular del GD en el hipocampo.
- Mediante estudios inmunohistoquímicos, se ha detectado la expresión temprana de los receptores 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>7</sub>, lo que sugiere un rol importante en el desarrollo del SNC.
- Los receptores 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>7</sub> han sido estudiados en diferentes líneas celulares demostrando su acoplamiento a vías transduccionales tales como PI3K y MAPK, asociadas a plasticidad celular. Sin embargo, estos estudios no coinciden del todo con lo descrito en neuronas.
- En línea celular de neuroblastoma de ratón, agonistas serotoninérgicos aumentan el número y largo de neuritas, efecto asociado al 5HT<sub>1A</sub>-R.
- El estímulo con 5-HT en células hipocámpales de ratón, produce una disminución en el número de dendritas terciarias, sugiriendo una relación entre el 5HT<sub>1A</sub>-R y la morfología neuronal.
- La vía de las Rho GTPasas regulan el citoesqueleto a través de la modulación de la cofilina. Gα12 y Gα13 son efectores de esta vía y receptores serotoninérgicos tales como el 5HT<sub>4</sub>-R y 5HT<sub>7</sub>-R acoplados a estas proteínas producen efectos opuestos sobre el crecimiento neurítico, aunque que no se ha precisado cuáles son sus efectores río abajo.

De estas evidencias llama particularmente la atención *el papel de la neurotransmisión serotoninérgica sobre la neuroplasticidad, específicamente sobre la regulación de la morfología neuronal.*

## **2. HIPÓTESIS**

Agonistas de los receptores 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>7</sub> activan vías transduccionales que modulan el citoesqueleto, efectos que se asocian a cambios morfológicos de neuronas hipocampales en cultivos

## **3. OBJETIVOS**

1. Determinar en neuronas hipocampales con distinta madurez, el efecto de agonistas de los receptores serotoninérgicos 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>7</sub> sobre proteínas que participan en vías transduccionales, que tienen como blanco el citoesqueleto de microtúbulos y de actina, como Akt-GSK-3 $\beta$ , ERK y cofilina, respectivamente.
2. Determinar el efecto de agonistas de los receptores serotoninérgicos 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>7</sub> sobre la morfología de neuronas hipocampales con distinta madurez.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Reactivos generales

- **BioRAD Laboratories** (CA, EE.UU.): azul de bromo fenol, persulfato de amonio, Bis, *N, N'*-metilen-bis-acrilamida, acrilamida.
- **Merck** (Darmstadt, Alemania): Tris-HCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, NaCl, SDS, etanol absoluto (p.a.), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, ditiotreititol, glicerol, acrilamida, glicina, Tween 20, ácido bórico, glucosa.
- **Sigma-Aldrich** (Saint Louis, MO, EE.UU.): Rojo Ponceau, HEPES, EGTA, Tris-HCl, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, NaF, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, Triton X-100, Pipes, paraformaldehido, albumina de suero de bovino, EDTA.
- **Winkler** (E.E.U.U): Tris-base.
- **Invitrogen** (Carlsbad, CA, EE.UU.): TEMED.
- **J.T Baker**: Glutaraldehído al 25%.
- **Roche** (Basilee, Suiza): Cóctel inhibidor de proteasas 25X.
- **Termo Scientific** (Waltham, MA, E.E.U.U): Estándar de masa molecular para geles de poliacrilamida.

### 4.2 Animales

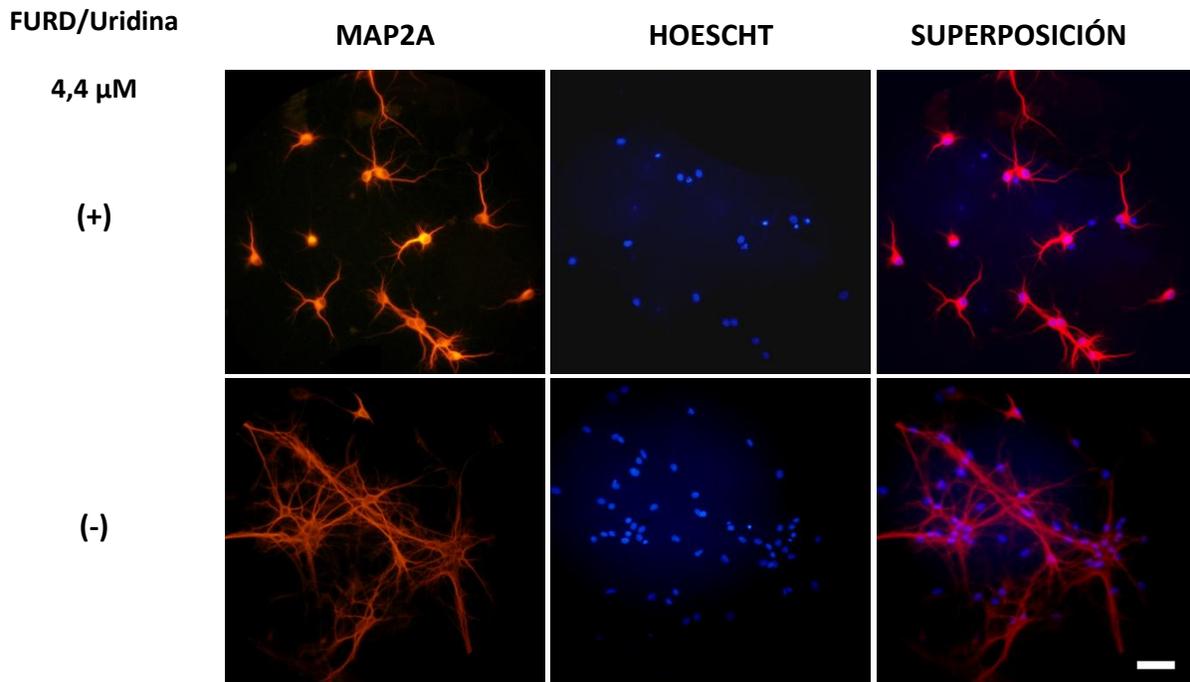
Para el desarrollo de este estudio, se utilizaron fetos de ratas Sprague-Dawley en estado de desarrollo con 18 días de gestación (E18), obtenidas del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Los experimentos con animales fueron aprobados por el Comité de Etica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile y por el Comité Asesor de Bioética de FONDECYT asociada al proyecto 1080489.

### 4.3 Cultivo primario de neuronas hipocampales

Los cultivos se realizaron de acuerdo a protocolos establecidos en nuestro laboratorio (Fiedler y cols., 1994) y modificados en esta Tesis. Brevemente, ambos hipocampos fueron disecados desde los cerebros de ratas con E18. El tejido se sometió a digestión enzimática en una solución de tripsina al 0,5% (Biological industries, Israel) y Hank 1x (Hepes 1mM, NaCl 8 mM, KCl 5 mM, glucosa 5 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,44  $\mu\text{M}$ ) durante 15 min. Posteriormente la digestión se detuvo con 1 ml de DMEM (Sigma-Aldrich, St Louis MO, E.E.U.U) suplementado con suero bovino fetal al 10 % (Hyclone), Glutamax <sup>TM</sup> 2 mM Gibco, Invitrogen E.E.U.U.), piruvato de sodio 1 mM (Sigma-Aldrich, St Louis MO, E.E.U.U) y 50 UI/mL de penicilina-estreptomicina (Gibco, Invitrogen E.E.U.U.) y se centrifugó a 235 x g durante 4 min. El sedimento se resuspendió con una pipeta pasteur en DMEM para disgregar las células. Posteriormente para ensayos de Western blot, las células se sembraron  $1 \times 10^6$  y 250.000 células sobre placas de petri de 60 mm pretratadas con poli-D-lisina 0,1 mg/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, E.E.U.U). Para ensayos de inmunocitoquímica e inmunofluorescencia, se sembraron 80.000 células en placas de petri de 35 mm con cubre objetos de 12,5 mm pretratados con poli-D-lisina 0,1 mg/mL. Las células utilizadas para Western e inmunofluorescencia, se mantuvieron durante 2 h en medio DMEM con suero al 10% en un incubador con 5%  $\text{CO}_2$  y mantenido a 37°C. Posteriormente, el medio se reemplazó completamente por Neurobasal<sup>TM</sup>, que es un medio adecuado para el crecimiento de neuronas embrionarias hipocampales de rata (Gibco, Invitrogen E.E.U.U.). Este medio se suplementó con B27 1% (Gibco, Invitrogen E.E.U.U.), Glutamax <sup>TM</sup> 2 mM, piruvato de sodio 1 mM y 50 UI/mL de penicilina-estreptomicina. Para inhibir el crecimiento glial, luego de 2 días de cultivo, se agregó una mezcla del inhibidor de mitosis 5-fluoro-2-deoxiuridina/uridina (Sigma-Aldrich, St Louis MO, E.E.U.U) a una concentración final de 4,4  $\mu\text{M}$  y mantenido durante 24 h y posteriormente se reemplazó por medio fresco. En la Figura 4, se muestran neuronas de 8 DIV en presencia o ausencia del inhibidor de mitosis, destacándose que en primer caso el cultivo está compuesto mayormente por neuronas (Figura 4).

#### 4.4 Estrategia farmacológica utilizada

Las células fueron incubadas por 5-60 minutos (Western blot) ó 24 horas (evaluación de la morfología neuronal) con serotonina y el agonista de receptores 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>7</sub>, 8-hidroxi-N,N-dipropil-2-aminotetralin (8-OH-DPAT) (Sigma-Aldrich, St Louis MO, E.E.U.U). Para discernir los efectos provocados por la activación de los receptores serotoninérgicos, se utilizaron los antagonistas específicos WAY-100635 (Sigma-Aldrich, St Louis MO, E.E.U.U), para el 5HT<sub>1A</sub>-R y SB269970 (TOCRIS bioscience) para el receptor 5HT<sub>7</sub>-R. Los fármacos utilizados se agregaron a las células en medio neurobasal (Figura 5). En la Tabla 2 se muestran las Ki de los fármacos para cada receptor.

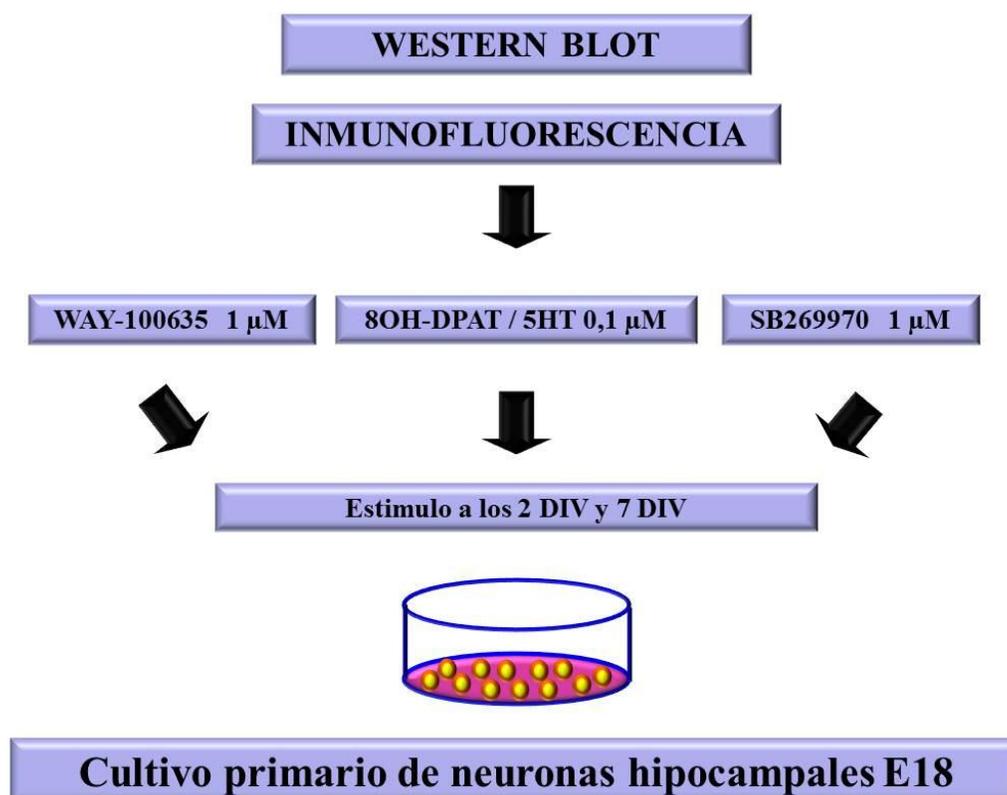


**Figura 4. Imágenes representativas de los cultivos de neuronas de hipocampo de rata E18 a los 8 DIV con y sin inhibidor de mitosis.** Se sembraron 80.000 células en placas de 35 mm con cubre objetos de 12,5 mm previamente tratados con poli-D-lisina. El inhibidor de mitosis se agregó al medio a los 2 DIV por 24 h, posteriormente se cambió por medio fresco. En la figura se muestran fotografías capturadas en un microscopio de epifluorescencia (Zeiss, Axioscop 20, Alemania) utilizando un objetivo de 40X. Se observa inmunofluorescencia para MAP2A (marcador dendrítico) y Hoechst (marcador nuclear). La barra representa 50  $\mu$ m.

**Tabla 2. Constantes de inhibición (Ki) de agonistas y antagonistas serotoninérgicos utilizados.**

	Ki 5HT <sub>1A</sub> nM	Ki 5HT <sub>7</sub> nM	Concentraciones Utilizadas nM	Tiempo de estímulo para western (min)	Tiempo de estímulo para el estudio morfológico (h)
<b>5-HT</b>	1	1	100	5, 10, 15	24
<b>8OH-DPAT</b>	10	52	10-100	5-60	24
<b>WAY-100635</b>	10	672	1000	5, 10, 15	24
<b>SB269970</b>	1000	1,3	1000	5, 10, 15	24

La tabla muestra las concentraciones de los fármacos utilizados y los tiempos de estimulación para cada experimento. (Forster y cols., 1995; Hagan y cols., 2000; Wood y cols., 2000; Thomas y cols., 2002).



**Figura 5. Resumen de la estrategia farmacológica utilizada en cultivos primarios de neuronas hipocampales.** Los antagonistas serotoninérgicos WAY-100635 y SB269970 se agregaron 30 min antes del estímulo realizado con el agonista 8OH-DPAT. Para determinar la participación de los receptores 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>7</sub> sobre la activación de las cascadas transduccionales de interés, las células (2 y 7 DIV) fueron estimuladas durante 5-60 min para Western blot y por 24 h para el estudio de la morfología neuronal mediante inmunofluorescencia.

#### 4.5 Obtención de extractos neuronales

La determinación de los niveles de proteínas y las variaciones relativa en sus estados de fosforilación se realizó de acuerdo a protocolos estandarizados en el laboratorio. Brevemente, las células luego de ser sometidas a los diferentes estímulos, fueron homogenizadas a 4°C en 150 µL de tampón de lisis (Tris HCl 50 mM pH = 7, NaCl 150 mM, EGTA 0,1 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 0,5 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 0,1 mM, NaF 0,02 mM, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0,025 mM, Tritón X-100 1,0%) y en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas (extracto de páncreas 0,8 µg/mL, termolisina 20 ng/mL, quimiotripsina 8-80 ng/mL, tripsina 8-80 ng/mL y papaína 13,2 µg/mL; Roche, Basilea, Suiza). Las muestras fueron sonicadas (Transsonic Digital D-78224 SinGen/HTW, ELMA, Alemania) a 4°C durante 5 min y luego centrifugadas (Labofuge 400, Heraeus Instruments, Alemania) a 21.380 x g durante 30 min a 4°C y se descartó el sedimento. En el sobrenadante se realizó la cuantificación de las proteínas mediante un kit (Pierce BCA Protein assay kit, IL. EE.UU.), que se basa en el método del ácido bicinconínico (Sapan y cols., 1999) en microplacas y que usa suero bovino albúmina (BSA) como estándar y se midió la absorbancia a 562 nm. Una vez conocida la concentración de proteínas, las muestras se desnaturaron en una relación 3:1 con un tampón de carga (concentración final de: Tris 250 mM pH 6,8, SDS 5%, glicerol 6,7% v/v, DTT 0,512 mg/mL, azul de bromo fenol 13,33 mg/mL). Finalmente, las muestras se alicuotaron e hirvieron a 100°C durante 10 min y por último las muestras se congelaron a -80 °C para su análisis mediante Western blot.

#### 4.6 Electroforesis y Western blot

Las proteínas se resolvieron en un gel de poliacrilamida-SDS, utilizando un gel concentrador compuesto por 5% de acrilamida/bis-acrilamida (29:1), SDS 0,1%, Tris 125 mM a pH 6,8 y el gel separador por Tris 375 mM pH 8,8; SDS 0,1% y 12% o 15% de acrilamida/bis-acrilamida (29:1). La electroforesis se realizó en una cámara de

electroforesis (Mini Protean III, BioRad, EE.UU.) siendo el tampón de corrida Tris 2,5 mM, SDS 0,01%, glicina 19 mM. Luego se realizó la electrotransferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa de poro de 0,2  $\mu\text{m}$  (proteínas > 40 kDa) o PVDF de poro 0,2  $\mu\text{m}$  (proteínas < 40 kDa como la cofilina) (BioRad, EE.UU) en una celda de transferencia mini Trans-blot. Como tampón de transferencia se utilizó glicina 19 mM, Tris 2,5 mM en metanol 20%. La transferencia se llevó a cabo en una fuente con hielo (aproximadamente a 4°C). Como control de transferencia, las proteínas se tiñeron con una solución de rojo Ponceau al 0,2%. Posteriormente las membranas se lavaron exhaustivamente con PBS 1X con ó sin Tween 20 (PBS-T) o TBS 1X con ó sin Tween 20 (TBS-T), dependiendo de las proteínas a evaluar.

Mediante esta técnica se determinaron los niveles de las proteínas de interés, el grado de fosforilación tanto en estado basal como luego de la adición de los agonistas y antagonistas serotoninérgicos. Las membranas se bloquearon e incubaron toda la noche con anticuerpos específicos para la Akt, GSK-3 $\beta$ , cofilina, ERK (formas fosforiladas y total) y de los receptores 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>7</sub>. Al día siguiente se lavaron e incubaron por 2 h con agitación a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios correspondientes acoplados a peroxidasa de rábano. En la Tabla 3 se resumen los anticuerpos y las condiciones utilizadas para la determinación de cada proteína. Las membranas se lavaron e incubaron con el reactivo de quimioluminiscencia durante 1 min (PerkinElmer, Massachusetts, E.E.U.U). Las bandas obtenidas en los films fotográficos BioMax (Kodak) se analizaron mediante densitometría con el programa UN-SCAN-IT gel, Automated Digitizing System Versión 4,1 Windows usando un escáner ColorPage-HR6X, Genius. Para determinar cambios semicuantitativos, los niveles de las proteínas se normalizaron respecto a los niveles de  $\beta$ -actina.

**Tabla 3. Anticuerpos y condiciones utilizadas para la determinación de las proteínas por Western blot.**

<b>Proteína Peso molecular</b>	<b>Anticuerpo 1° Marca # catálogo</b>	<b>Huésped</b>	<b>Dilución Anticuerpo 1°</b>	<b>Solución de bloqueo e incubación</b>	<b>Solución de lavado</b>
<b>5HT<sub>1A</sub> 55/65 kDa</b>	Anti-5HT <sub>1A</sub> Santa cruz SC-10801	Conejo	1:500	Leche 3 % TBS-1X-T0,1% Leche 1,5 % TBS-1X-T0,1%	TBS-1X-T0,1%
<b>5HT<sub>7</sub> 50 kDa</b>	Anti-5HT <sub>7</sub> Abcam Ab13898	Conejo	1:250	Leche 3 % TBS-1X-T0,1% Leche 1 % TBS-1X-T0,1%	TBS-1X-T0,1%
<b>AKT-p 60 kDa</b>	Anti-AKT-P signaling 9271	Conejo	1:500	Leche 0,5 % PBS 1X	PBS 1X
<b>AKT 60 kDa</b>	Anti-AKT Santa cruz SC-8312	Conejo	1:500	Leche 2 % PBS 1X	PBS 1X
<b>GSK-3β-p 47 kDa</b>	Anti-GSK3β-P Santa cruz SC-11757	Cabra	1:500	Leche 3 % TBS-1X-T0,1%	TBS-1X-T0,1%
<b>GSK-3β 47 kDa</b>	Anti-GSK3β Santa cruz SC-7291	Ratón	1:500	Leche 1 % TBS-1X-T0,1%	TBS-1X-T0,1%
<b>Cofilina-p 19 kDa</b>	Anti-Cofilina-P Cell signalling 3313	Conejo	1:1000	BSA 5 % TBS-1X-T0,1%	TBS-1X-T0,1%
<b>Cofilina 19 kDa</b>	Anti-Cofilina Cytoskeleton AFCFL02	Conejo	1:8000	Leche 3 % TBS-1X-T0,1%	TBS-1X-T0,1%
<b>Beta actina 42 kDa</b>	Anti-actina SIGMA A 5066	Conejo	1:3000	Leche 3 % TBS-1X-T0,1%	TBS-1X-T0,1%
<b>ERK-p 42/44 kDa</b>	Anti-ERK-P Cell signaling 4377	Conejo	1:1000	Leche 3 % PBS 1X	PBS 1X
<b>ERK 42/44 kDa</b>	Anti-ERK Santa cruz SC-94	Conejo	1:1000	Leche 3 % PBS 1X	PBS 1X

#### 4.7 Inmunocitoquímica

Las células mantenidas en cubre objetos se fijaron y permeabilizaron de acuerdo a protocolos establecidos (Witte y cols., 2008). Brevemente, las neuronas previamente cultivadas (3 y 8 DIV) se fijaron y permeabilizaron simultáneamente a 4°C durante 15 min en glutaraldehído 0,25%, paraformaldehído 3,7%, sacarosa 3,7% y Tritón X-100 0,1% disuelto en medio PHEM (Pipes 60 mM, Hepes 25 mM, EGTA 5 mM y MgCl 1 mM, pH 6,9). Para reducir la autofluorescencia de las células, se agregó NH<sub>4</sub>Cl 50 mM durante 5 min. Posteriormente, las neuronas se incubaron en solución de bloqueo al 100% durante 1 h a temperatura ambiente (PBS 1X, suero bovino fetal al 2%, albúmina de suero de bovino al 2% y gelatina de pescado (Sigma-Aldrich) al 0,2%). El anticuerpo primario se agregó en solución de bloqueo al 10%. Para la detección de los receptores en las neuronas, se realizaron doble inmunofluorescencia con anti-5HT<sub>1A</sub> o anti- 5HT<sub>7</sub> y tubulina acetilada o MAP2A. Para el estudio de la morfología neuronal se utilizó tubulina acetilada a los 3 *días in vitro* (DIV) (marcador de microtúbulos estables) y como trazador dendrítico la marcación con anti-MAP2A a los 8 DIV, junto a Faloidina-rodamina que se une a la F-actina. Luego de la incubación de las células con el anticuerpo primario toda la noche, las células se lavaron e incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario fluorescente respectivo (Tabla 4). En el caso de requerir doble inmunofluorescencia, después del anticuerpo secundario se incubó con un segundo anticuerpo primario y posteriormente se continuó con el mismo procedimiento anterior. Para el estudio de la morfología se utilizó faloidina-rodamina por 30 minutos (1:500, Invitrogen). Finalmente los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342 (Molecular Probes, Oregon, Canadá) 0,5 µg/mL por 5 min. Posteriormente las células se lavaron y montaron sobre un porta objeto con medio para fluorescencia (Dako Mounting Medium, Sigma-Aldrich). En la Tabla 4 se resumen las condiciones utilizadas en la técnica de inmunofluorescencia.

**Tabla 4. Anticuerpos utilizados para inmunocitoquímica.**

<b>Proteína</b>	<b>Anticuerpo 1° Marca # catálogo</b>	<b>Huésped</b>	<b>dilución</b>	<b>Anticuerpo 2° Marca # catálogo</b>
<b>5HT<sub>1A</sub></b>	Anti-5HT <sub>1A</sub> Santa cruz SC-10801	Cabra	1:50	Alexa fluor 488 IgG conejo Molecular probes A11008
<b>5HT<sub>7</sub></b>	Anti-5HT <sub>7</sub> Santa cruz SC-28963	Cabra	1:50	Alexa fluor 488 IgG conejo Molecular probes A11008
<b>MAP2A</b>	Anti-MAP2A Sigma-Aldrich M4403	Burro	1:1000	Alexa fluor 568 IgG ratón Molecular probes A10037
<b>Tubulina Acetilada</b>	Anti-tub ac Sigma-Aldrich T7451	Burro	1:20000	Alexa fluor 568 IgG ratón Molecular probes A10037
<b>MAP2A</b>	Anti-MAP2A Sigma-Aldrich M4403	Cabra	1:1000	Alexa fluor 488 IGG ratón Molecular probes A11001

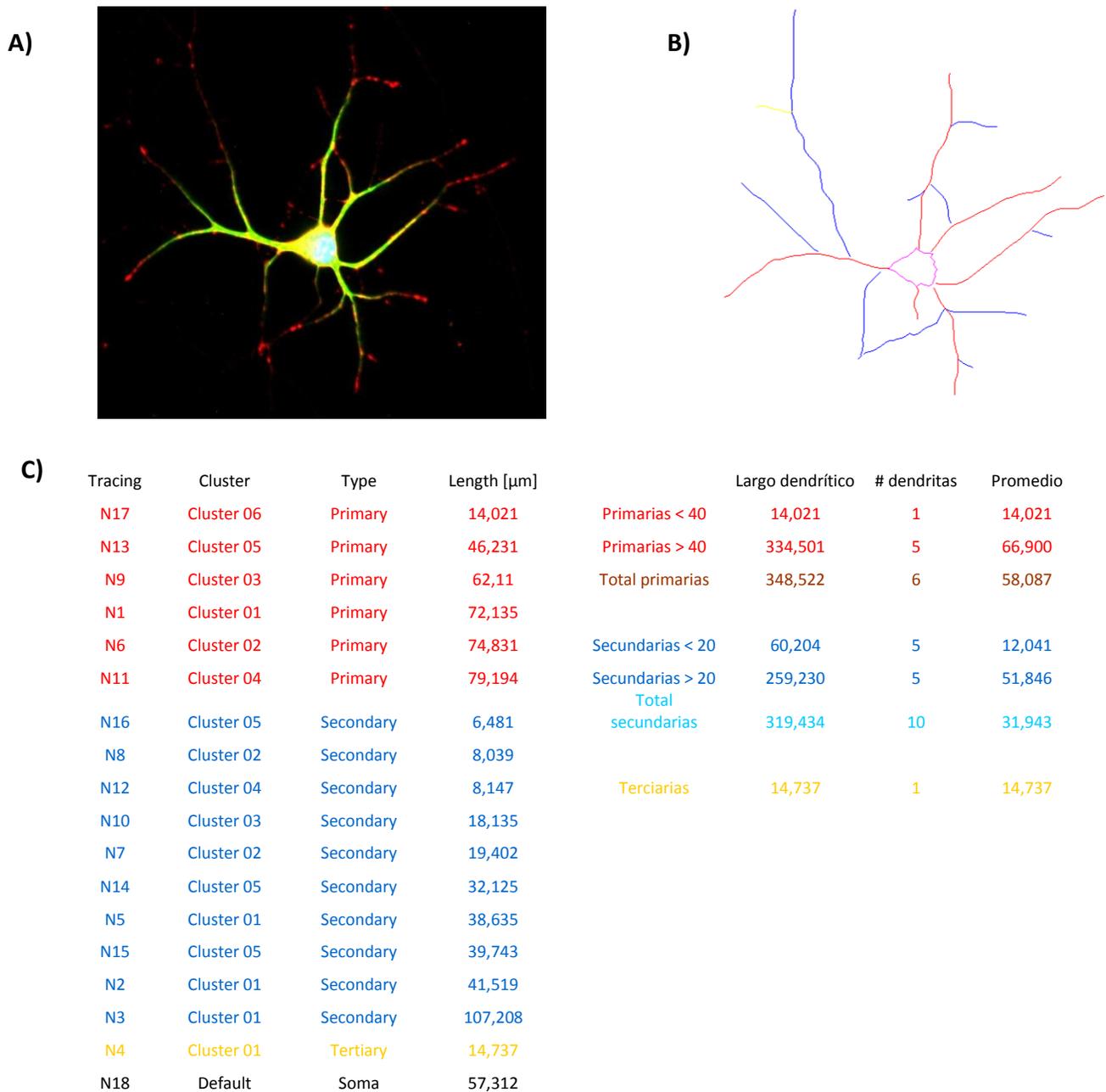
#### 4.8 Cuantificación del largo y número de neuritas/dendritas y análisis de Sholl.

El objetivo fue observar los efectos de agonistas serotoninérgicos sobre la complejidad de neuritas y dendritas y su prevención mediante el uso de antagonistas específicos. A los 2 y 7 DIV, las células se estimularon durante 24 horas con los agonistas serotoninérgicos y para detectar la especificidad, los antagonistas fueron agregados 30 min previos a la adición del agonista. Posteriormente, las células se fijaron y permeabilizaron de acuerdo al protocolo descrito anteriormente. Se realizó inmunocitoquímica con un anticuerpo monoclonal para tubulina acetilada ó MAP2A y tinción con faloidina-rodamina y marcador nuclear Hoechst (azul). Para determinar los cambios morfológicos, se determinó el número de neuritas y dendritas primarias, secundarias y terciarias mediante imágenes obtenidas a través de un microscopio confocal DSU (Olympus IX81, Japón) y las fotografías se tomaron con una magnificación de 40 X (Figura 6).

Los criterios utilizados para la selección de células a analizar fueron que éstas presentaran: (1) morfología neuronal, (2) neuritas y dendritas definidas, (3) conos de crecimiento sin contacto con otras células, para evitar la interferencia en los análisis y (4) características de célula viva (adhesión, ausencia de cuerpos apoptóticos, etc).

#### 4.9 Análisis de imágenes

Una vez obtenidas las fotografías, éstas se procesaron en el programa ImageJ (NIH, [rsb.info.nih.gov/ij](http://rsb.info.nih.gov/ij)) para obtener la imagen fusionada de las tres señales correspondiente a la emisión de cada fluoróforo. A través de la tinción nuclear se pudo verificar que las señales correspondían a una sola neurona, mientras que la tinción de los filamentos de actina (faloidina-rodamina, señal roja) permitió una mejor aproximación al largo verdadero de las proyecciones, al poder visualizar el cono de crecimiento. Para reconocer las neuritas y dendritas se utilizó tubulina acetilada y MAP2A mediante inmunofluorescencia indirecta, utilizando un anticuerpo secundario Alexa Fluor (verde) (Figura 6). La cuantificación del largo de neuritas y dendritas se realizó a través del programa NeuronJ. Para hacer un análisis “doble ciego”, se tomaron las siguientes precauciones: (1) las imágenes se renombraron aleatoriamente a través del programa BlindTreatment.jar (Popko y cols., 2009), el que fue proporcionado por la Dra. Lorene Lanier (Universidad de Minnesota, E.E.U.U.) y (2) La obtención de las imágenes y su cuantificación en NeuronJ se realizaron por distintas personas. Luego del trazado de las proyecciones a través de NeuronJ, se determinó la variación en el largo y en el número de neuritas y dendritas, a través de la exportación de los datos desde NeuronJ a Microsoft Excel. Asimismo, a partir de estos datos fue posible generar un análisis de Sholl (Sholl 1953), utilizando un “esqueleto” de la imagen original. Para este fin se usó el programa Bonfire 1.0 (Bonnie Firestein Lab. Sholl Analysis Software, Universidad de Rutgers, E.E.U.U.), desarrollado para el software MATLAB 7.0 (MathWorks) (Langhammer y cols., 2010). Se requirió también del uso del programa NeuronStudio 0.9.92 (CNIC, Mount Sinai School of Medicine, E.E.U.U.) para la definición precisa de puntos de ramificación y puntos de término (Figura 7).

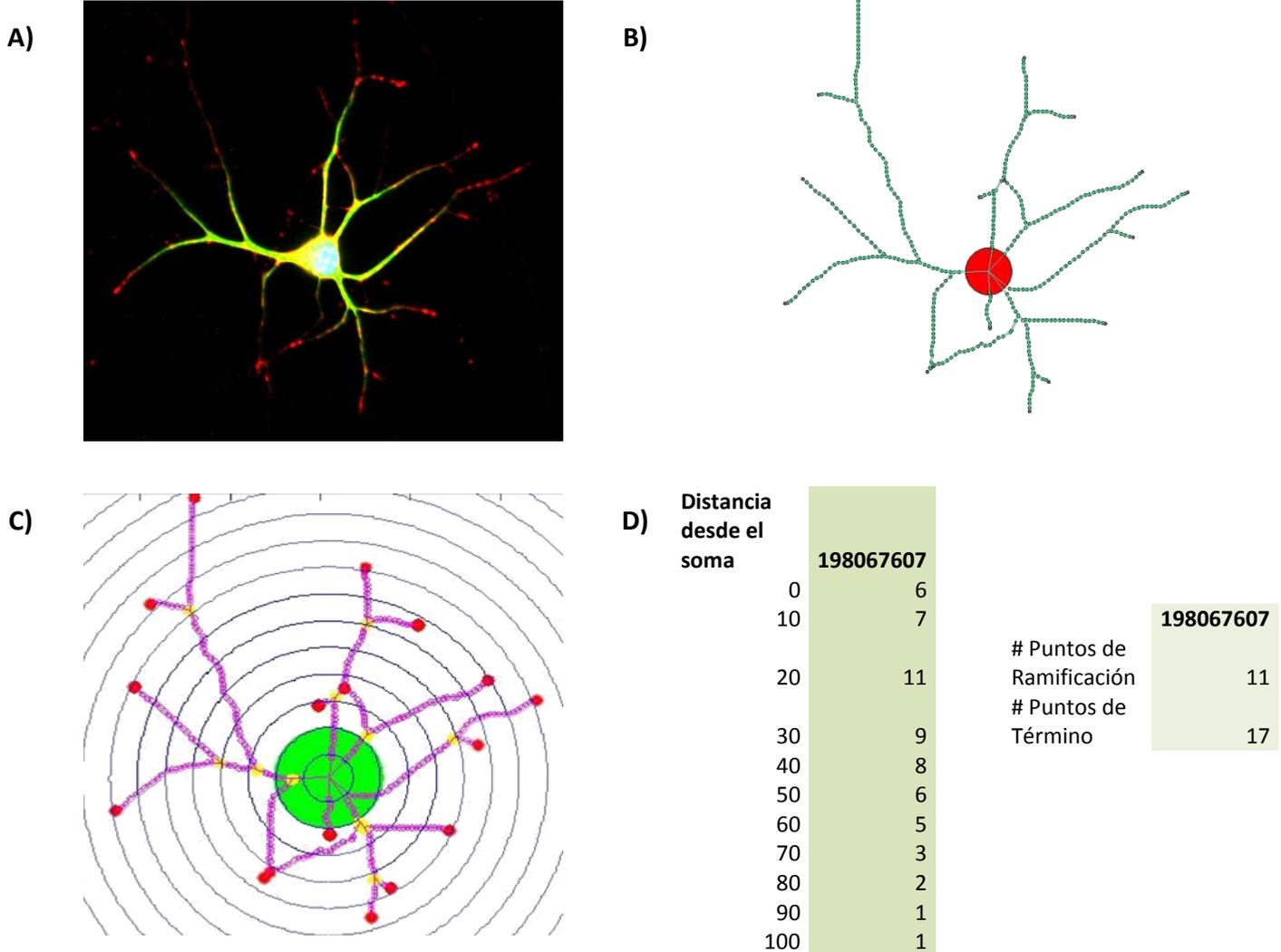


**Figura 6. Cuantificación del largo y número de neuritas/dendritas de neuronas hipocampales.** (A) Las neuronas son fotografiadas en un microscopio confocal DSU y los canales son integrados en el programa ImageJ. (Fluorescencia roja: faloidina-rodamina, fluorescencia verde: tubulina acetilada o MAP2A, fluorescencia azul: Hoechst). (B) A través del programa Neuron J las neuritas y dendritas son trazadas, diferenciándolas en primarias (rojo), secundarias (azul) y terciarias (amarillo). (C) Los datos (a la izquierda) son exportados a una hoja de cálculo de Microsoft Excel 2007, donde son calculados el largo dendrítico total, el número de dendritas y el largo dendrítico promedio (a la derecha). La imagen presentada en este esquema pertenece al grupo control.

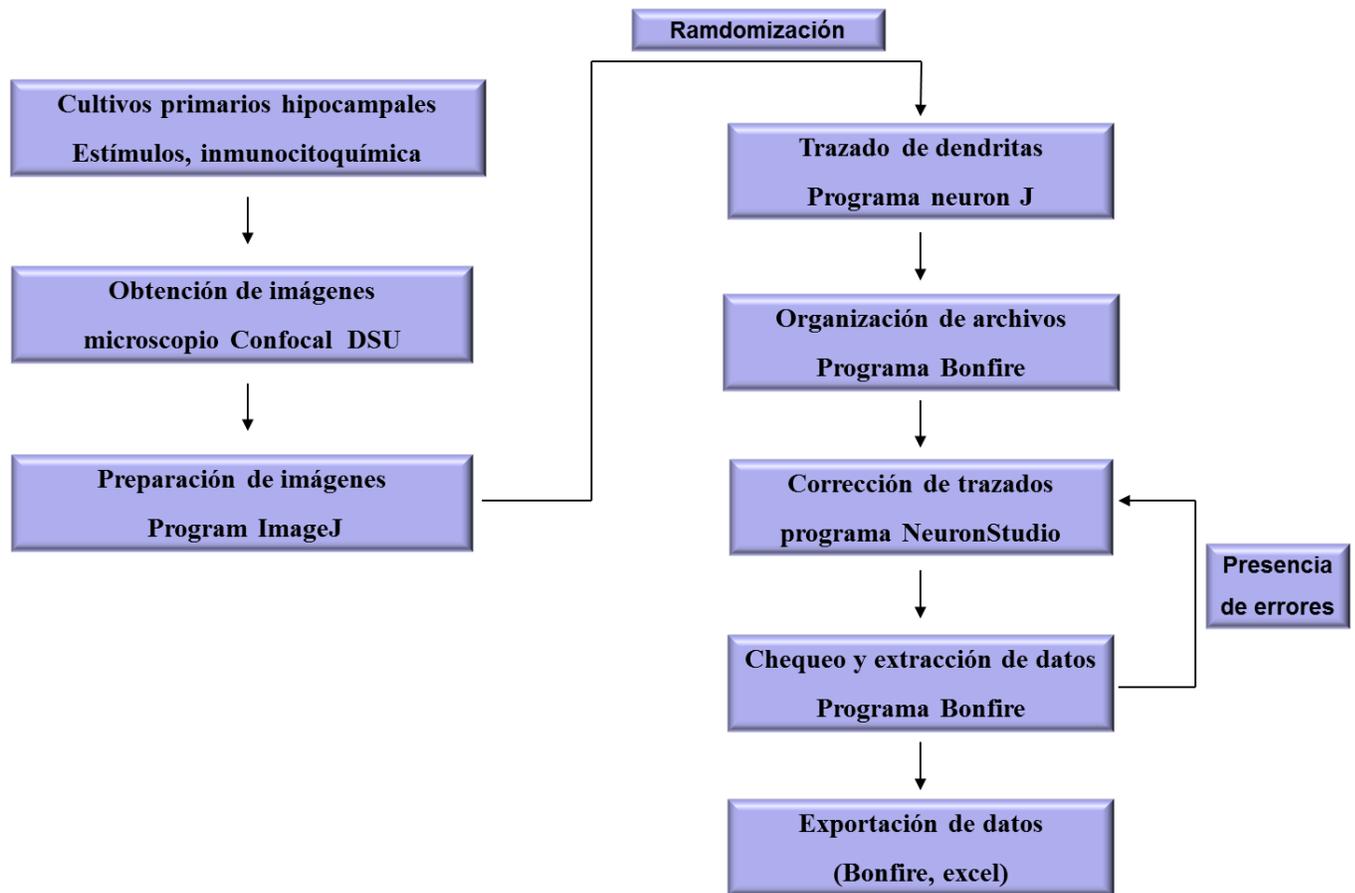
Una vez finalizado el procedimiento, se entregaron los resultados tabulados en hojas de cálculo de Microsoft Excel para su posterior análisis gráfico. En la Figura 8 se muestra el diagrama de flujo en que los resultados son obtenidos.

#### 4.10 Análisis estadístico

En el análisis de niveles de proteína por Western, cada experimento fue realizado a lo menos tres veces, cada uno de ellos duplicado o triplicado. En el caso de comparar entre controles y condición experimental, se utilizó el test de t para datos pareados. En el caso de múltiples comparaciones, los datos se analizaron mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Dunns. En la cuantificación de los cambios morfológicos promovidos por los agentes farmacológicos, el número experimental (n) correspondió al número total de neuronas analizadas proveniente de a lo menos 2-3 cultivos independientes. Los datos según su distribución se analizaron mediante el test de Student de dos colas o por el test de ANOVA de una vía junto con el post-test de Bonferroni. Se utilizó el programa computacional estadístico GraphPadPrisma 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).



**Figura 7. Análisis de Sholl de neuronas hipocampales.** (A) Las neuronas son fotografiadas en un microscopio confocal DSU y los canales son integrados en el programa ImageJ. (Fluorescencia roja: faloidina-rodamina, fluorescencia verde: tubulina acetilada o MAP2A, fluorescencia azul: Hoechst). Posteriormente las dendritas son trazadas en el programa NeuronJ (B) A través del programa NeuronStudio los trazos realizados para las neuronas son revisados para establecer la presencia de puntos de ramificación (*branching points*) y puntos de término (*ending points*) (C) Utilizando el programa Bonfire (en MATLAB 7.0) se analiza la información proveniente del programa NeuronStudio y se realiza el análisis de Sholl. (D) El número de intersecciones por círculo es exportado a una hoja de cálculo de Microsoft Excel 2007, junto con el número de puntos de ramificación y término. La imagen presentada en este esquema pertenece al grupo control.



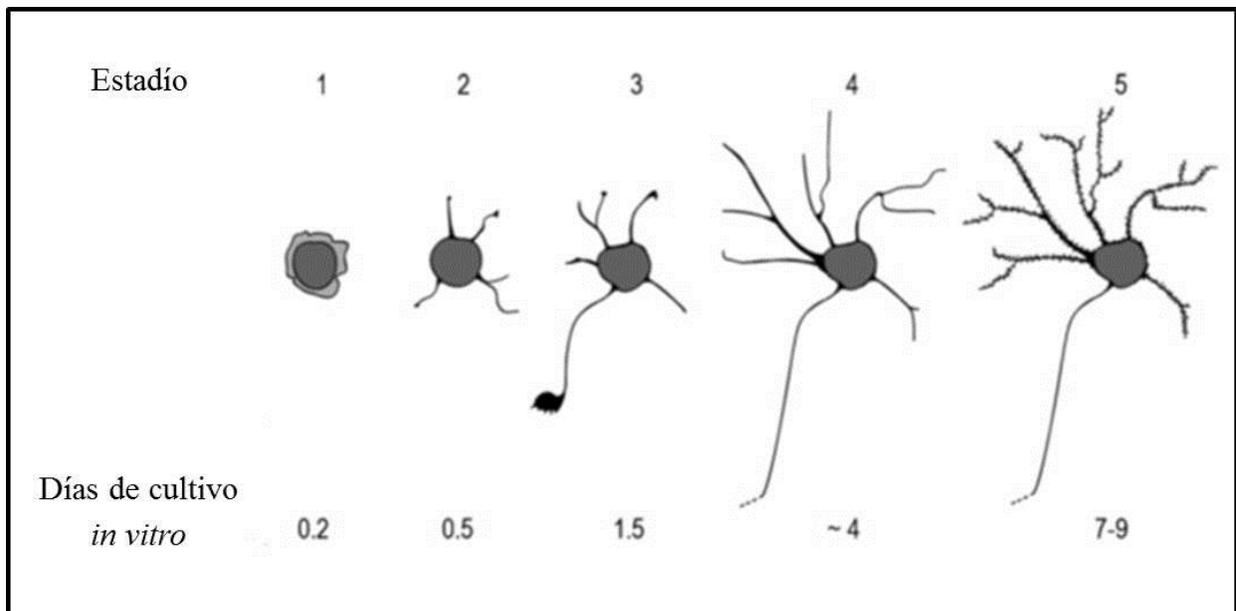
**Figura 8. Resumen de la estrategia utilizada para el análisis de imágenes y determinación de cambios morfológicos.** Diagrama de flujo que resume los pasos del procesamiento y análisis de imágenes para la cuantificación de los parámetros evaluados y determinación de la complejidad dendrítica.

## 5. RESULTADOS

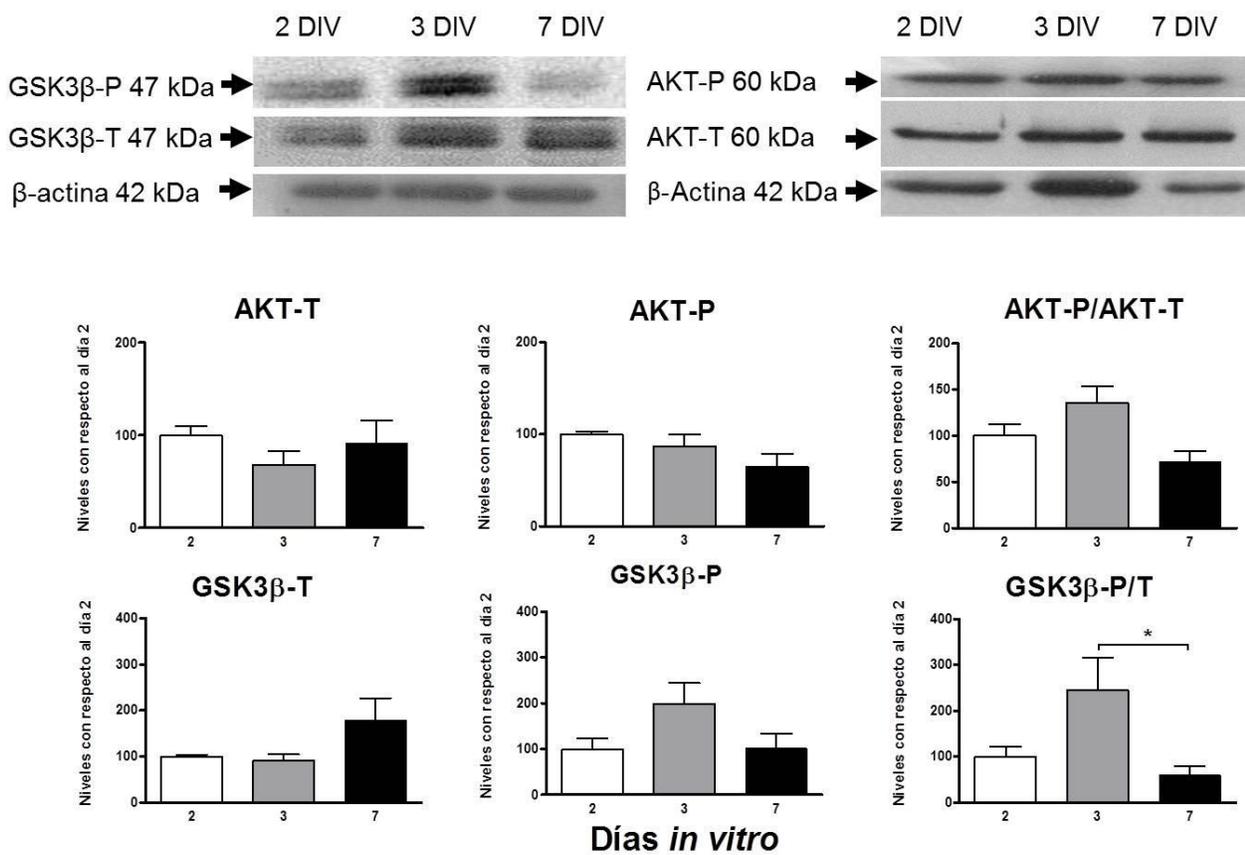
### 5.1 Caracterización de la morfología de neuritas a los 3 DIV

Con la finalidad de caracterizar la evolución morfológica de las neuronas hipocampales durante los días de cultivo se procedió a fijar las neuronas e identificar las neuritas mediante la inmunotinción de un marcador de microtúbulos estables como lo es la tubulina acetilada. Esta inmunotinción permite observar la morfología completa de la neurona, por lo que se tomaron las precauciones necesarias para analizar solo neuritas sin considerar el axón.

Las neuronas en cultivo inician un proceso de maduración que se traduce en cambios morfológicos que pueden ser observados durante 6 estadios (Figura 9). Durante los estadios 1-2 se observan neuronas no polarizadas con proyecciones del tipo lamelipodios que se convierten en pequeñas neuritas inmaduras. En el estadio 3, que ocurre entre 24-48 h de cultivo *in vitro*, una de las neuritas, la cual eventualmente se convertirá en el axón, se elonga rápidamente produciendo el primer signo morfológico de la polaridad neuronal (Tahirovic y cols., 2009). En la definición y crecimiento axonal la fosforilación de la GSK-3 $\beta$  se constituye como una etapa importante (Yoshimura y cols., 2005). De hecho, en esta Tesis se observa un incremento significativo en el estado de fosforilación en Ser<sup>9</sup> de la GSK-3 $\beta$  a las 72 h de cultivo, quinasa río abajo de la Akt; efecto acompañado de un aumento no significativo de la fosforilación en Ser<sup>473</sup> de la Akt (Figura 10). Durante el estadio 4, las neuritas se elongan lentamente para transformarse en dendritas. En el estadio 5, que se observa a tiempos posteriores de una semana de cultivo, ocurre una polarización funcional de axones y dendritas incluyendo la formación de la sinapsis (Figura 9). En el estadio 6, que se obtiene por sobre las 2 semanas del cultivo, el axón y las dendritas se elongan y se vuelven altamente ramificadas y aparecen las estructuras altamente especializadas denominadas espinas dendríticas (MacLaurin y cols., 2007). De acuerdo a la morfología observada en los cultivos a los 3 DIV mediante inmunofluorescencia para tubulina acetilada, estos se encuentran entre los estadios 3 y 4, lo que permitió discernir entre el axón y las neuritas.



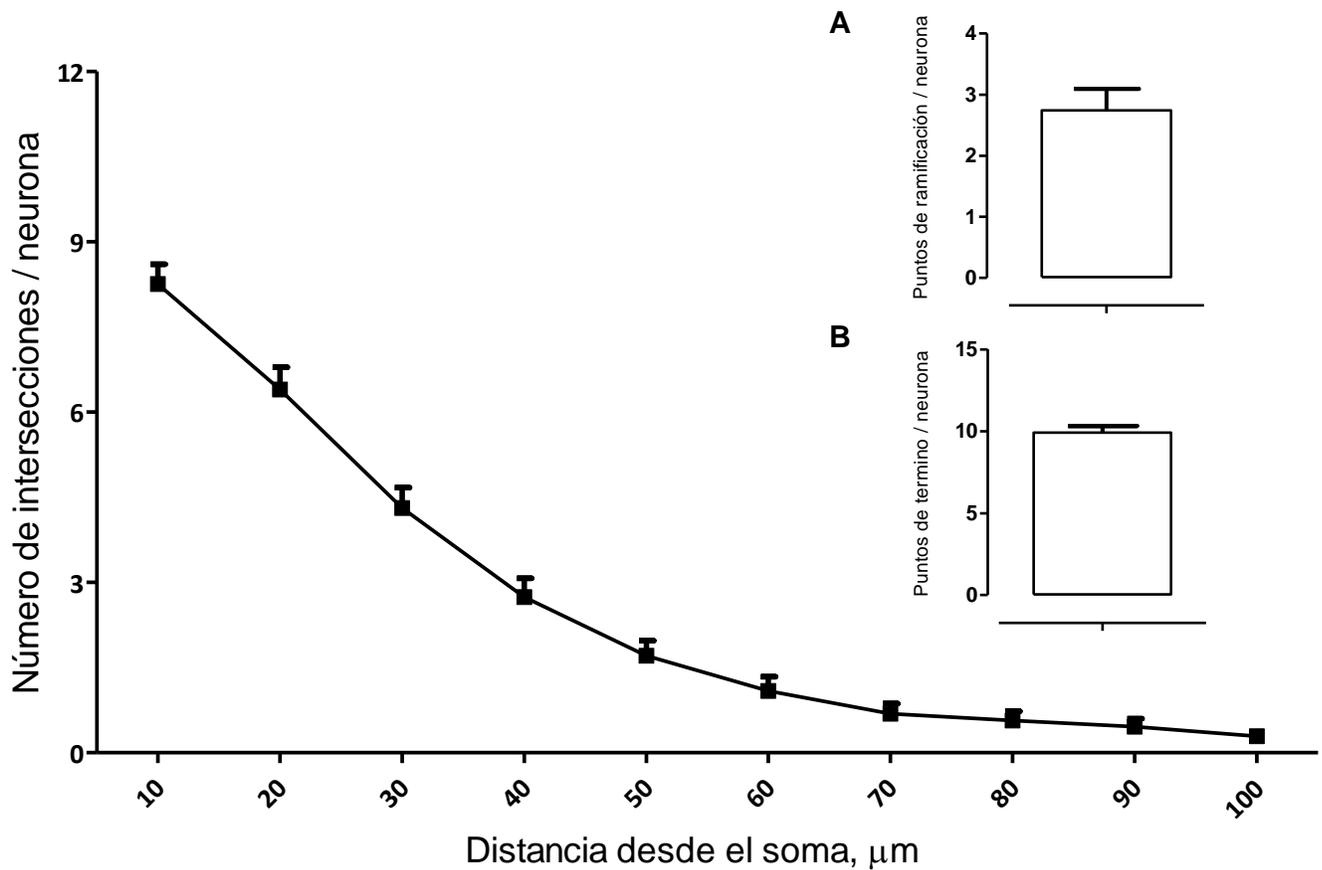
**Figura 9. Estadios del desarrollo de neuronas hipocámpales en cultivo.** Se observan cinco estadios neuronales. En el estadio 1 las células se adhieren a la matriz y forman lamelipodios. En el estadio 2, se forman protrusiones dinámicas menores (neuritas). En el estadio 3, una de las neuritas se convierte en axón, que elonga rápidamente. En el estadio 4 ocurre el crecimiento dendrítico y en el estadio 5 su ramificación. A mayores días del cultivo se obtiene la madurez neuronal, que involucra la sinaptogénesis. Adaptado de Kessels (Kessels y cols., 2011).



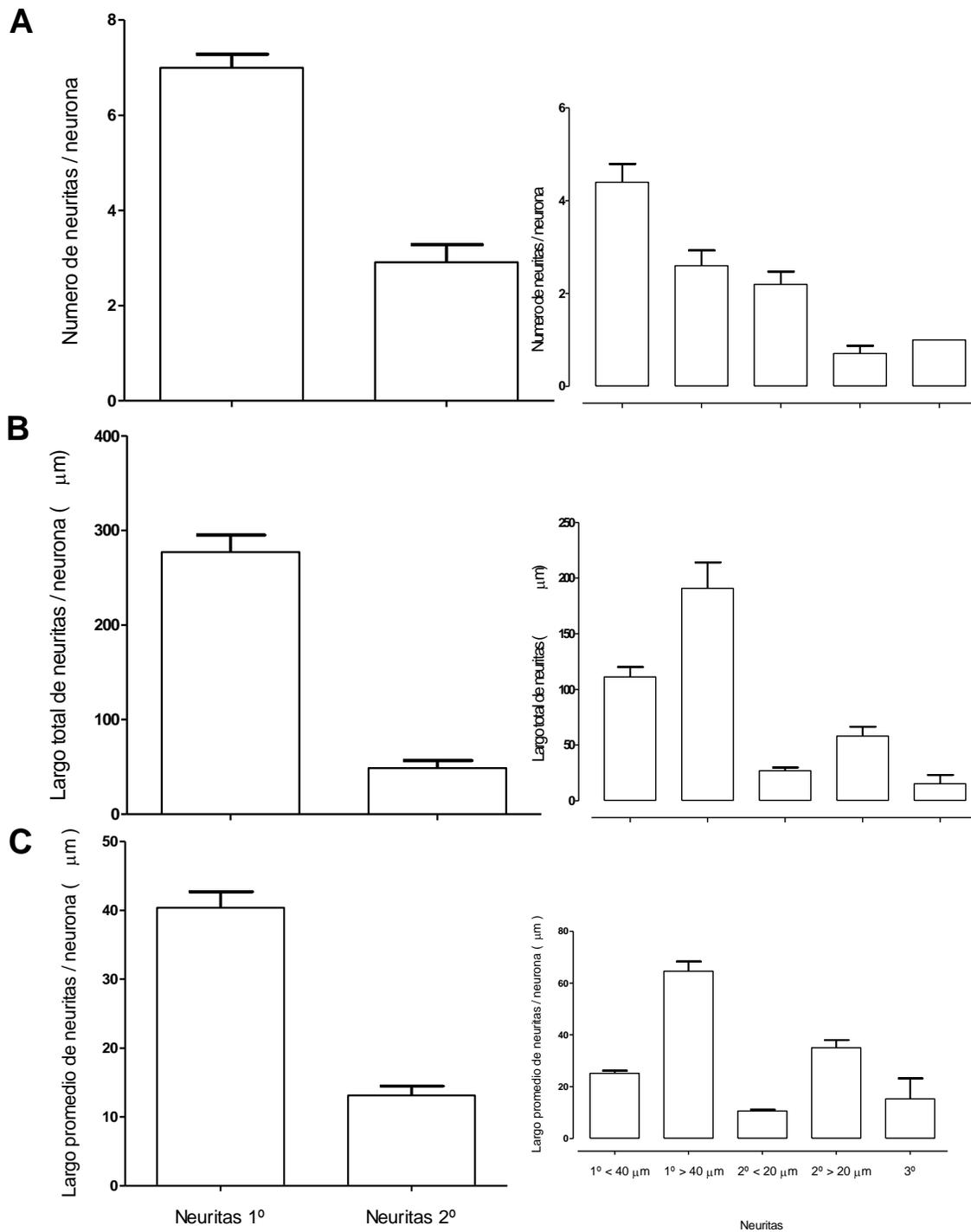
**Figura 10. Determinación de los niveles de la proteína Akt y GSK-3β durante los días de cultivo *in vitro* de neuronas de hipocampo de rata E18 por Western.** Los valores representan el promedio  $\pm$  error estándar de la media. Valores correspondientes a 3 cultivos independientes y cada muestra realizada en triplicado (n=3). Test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Dunns (Akt-T/ $\beta$ -actina p= 0,45, Akt-P/ $\beta$ -actina p= 0,14, Akt-P/Akt-T p= 0,0639; GSK-3 $\beta$ -T/ $\beta$ -actina p= 0,0799, GSK-3 $\beta$ -P/ $\beta$ -actina p= 0,2987, GSK-3 $\beta$ -P/GSK-3 $\beta$ -T p= 0,0349). \*p<0,05.

Se efectuó el análisis de Sholl a los 3 DIV, que consiste en determinar el número de neuritas que intersectan anillos concéntricos que se alejan del soma en incrementos de 10  $\mu\text{m}$ . Como se observa en la Figura 11, existe un máximo de intersecciones en las primeras 10  $\mu\text{m}$ . Al incrementar la distancia desde el soma, se observa una disminución de las intersecciones, lo que indica una menor complejidad. Junto con los datos del análisis de Sholl es posible obtener de forma complementaria el número de puntos de término y puntos de ramificación por neurona (inserto Figura 11).

Para un análisis más acabado de los cambios observados producto de los días de cultivo, las neuritas fueron clasificadas como primarias, secundarias y terciarias; donde las primeras a su vez se segregaron de acuerdo a su longitud (primarias  $<40 \mu\text{m}>$  y secundarias  $<20 \mu\text{m}>$ ). Como se observa en la Figura 12 A, a este día de cultivo *in vitro*, las neuronas poseen un mayor número de neuritas primarias que secundarias, siendo las neuritas primarias mayoritariamente cortas ( $<40 \mu\text{m}$ ). Además del número de neuritas, se determinaron el largo de neuritas total (Figura 12 B) y el largo de neuritas promedio (Figura 12 C), que permiten determinar si existen cambios morfológicos asociados al crecimiento o a la retracción de las neuritas.



**Figura 11. Análisis de Sholl de cultivos primarios hipocampales de 3 DIV.** Las neuronas se fijaron e inmuno tiñeron para realizar el recuento del número de intersecciones en las neuronas (n=35) mediante el análisis de Sholl. Las neuronas se fotografiaron en un microscopio confocal DSU y las neuritas se trazaron en el programa NeuronJ. Mediante el programa NeuronStudio se estableció la presencia de puntos de ramificación y los puntos de término. Mediante el programa Bonfire (en MATLAB 7.0) se analizó la información proveniente del programa NeuronStudio y se realizó el análisis de Sholl. El número de intersecciones se obtuvo mediante el programa Bonfire. El número de puntos de ramificación y de término se muestran en los insertos A y B, respectivamente.



**Figura 12. Número y largo de neuritas en cultivos primarios hipocampales a los 3 DIV.** Las graficas muestran la variación de ciertos parámetros obtenidos de neuritas primarias, secundarias (izquierda) y a su vez segregadas en primarias menores y mayores de 40  $\mu\text{m}$ , secundarias menores y mayores de 20  $\mu\text{m}$ . En (A) se muestra el número de neuritas, en (B) la variación del largo de neuritas total y en (C) el cambio del largo de neuritas promedio ( $n=35$ ).

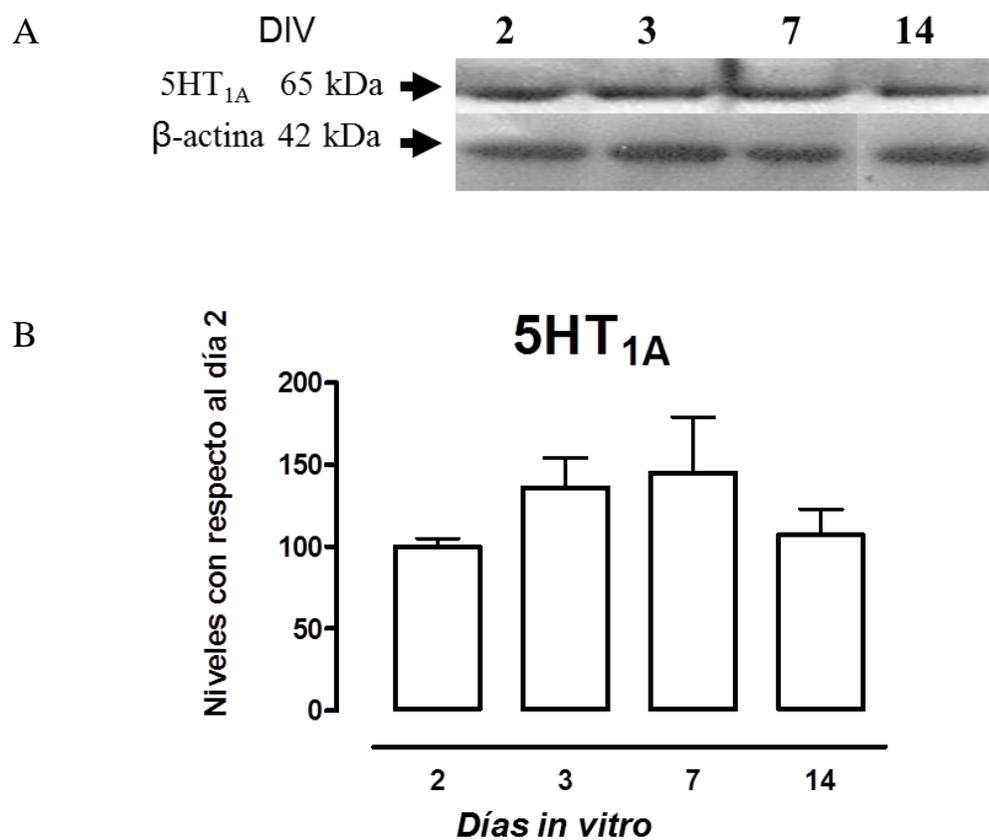
## 5.2 Evolución de los niveles y distribución de los receptores serotoninérgicos 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>7</sub> en neuronas hipocampales en función de los días de cultivo

Además del rol de la 5-HT como neurotransmisor en el sistema nervioso adulto, se ha sugerido que también puede ejercer acciones regulando el desarrollo del sistema nervioso. Consistente con esta idea, la 5-HT es uno de los primeros neurotransmisores en sintetizarse en el cerebro en desarrollo (Gaspar y cols., 2003) y regula diferentes procesos como proliferación, morfogénesis, migración neuronal, formación de sinapsis entre otros (Semkova y cols., 1998; Buznikov y cols., 2001; Gaspar y cols., 2003; Persico y cols., 2006). También se ha documentado que la activación de receptores serotoninérgicos es capaz de producir efectos neurotróficos. Por ejemplo, se ha descrito que la adición del agonista 8OH-DPAT a cultivos disociados de neuronas colinérgicas del núcleo septal de embriones promueve tanto el crecimiento dendrítico y sus ramificaciones (Riad y cols., 1994). El 5HT<sub>1A</sub>-R se expresa en neuronas piramidales de la corteza, septum, amígdala e hipotálamo (Sotelo y cols., 1990) y en el hipocampo (Chalmers y cols., 1991). Igualmente se ha descrito que el 5HT<sub>7</sub>-R se expresa en el tálamo, hipotálamo, corteza cerebral, hipocampo y amígdala (Hedlund y cols., 2004). Sin embargo, no se ha descrito en neuronas hipocampales como varían sus niveles y distribución durante los días de cultivo *in vitro*. Un objetivo importante fue estudiar el papel de la 5-HT sobre la morfología neuronal a través del estímulo de los receptores 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>7</sub>, el cual se realizó a tiempos tempranos y más tardíos del cultivo. Por esto último fue importante verificar la presencia de los receptores serotoninérgicos a distintos DIV. En la Figura 13 A, se muestra un gel representativo de extractos totales de neuronas hipocampales a distintos días del cultivo, donde se observa una banda de 65 kDa correspondiente al 5HT<sub>1A</sub>-R. También se detectaron bandas de aproximadamente 45 y 50 kDa (Figura 14 A) descritas en ratas y denominadas 5HT<sub>7(a)</sub> y 5HT<sub>7(b)</sub> (Ruat y cols., 1993), este último generado por la inserción de un codón de término en el extremo carboxilo terminal (Heidmann y cols., 1997; Jasper y cols., 1997). Mediante análisis semicuantitativos de los niveles de ambos receptores, se determinó que los niveles del 5HT<sub>1A</sub>-R no se modifican por la madurez del cultivo (Figura 13 B). En contraste, se observó que las isoformas del 5HT<sub>7</sub>-R (5HT<sub>7a</sub> y 5HT<sub>7b</sub>) incrementaron significativamente

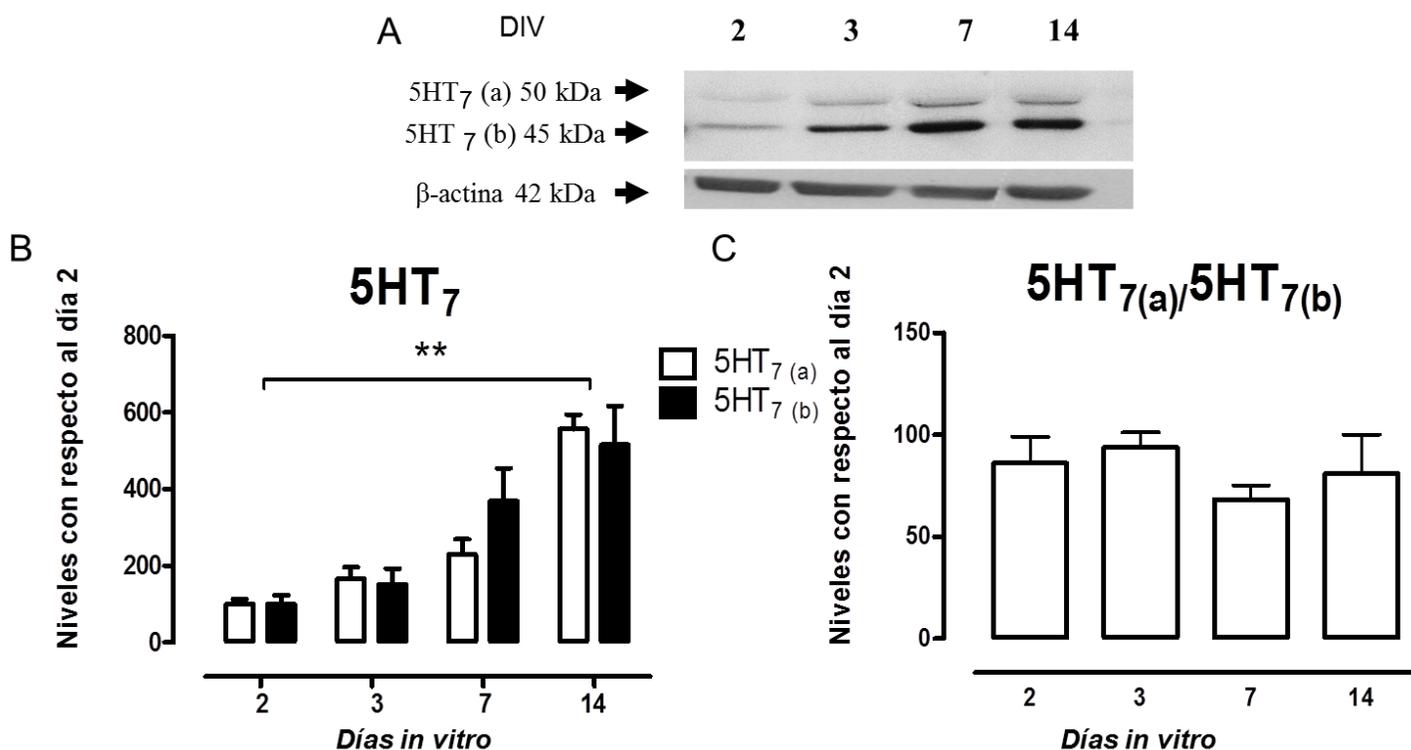
entre los 2 y 14 DIV (Figura 14 B), aunque, la relación entre ambas isoformas permanece constante durante la evolución del cultivo (Figura 14 C).

La evolución diferencial de la cuantía de estos receptores puede ser importante para el desarrollo de la morfología neuronal; siendo importante determinar la distribución en la neurona. Mediante inmunofluorescencia y utilizando un anticuerpo dirigido contra el tercer loop del 5HT<sub>1A</sub>-R (Albert y cols., 2001) observamos en células permeabilizadas una inmunoreactividad mayoritariamente somática del 5HT<sub>1A</sub>-R y cuya distribución no varío sustancialmente entre los 4 y 8 DIV. Utilizando un anticuerpo que reconoce un epítipo extracelular del receptor 5HT<sub>7</sub>-R, se determinó una distribución somato-dendrítica; que no cambió entre los 4 y 8 DIV (Figuras 15 y 16).

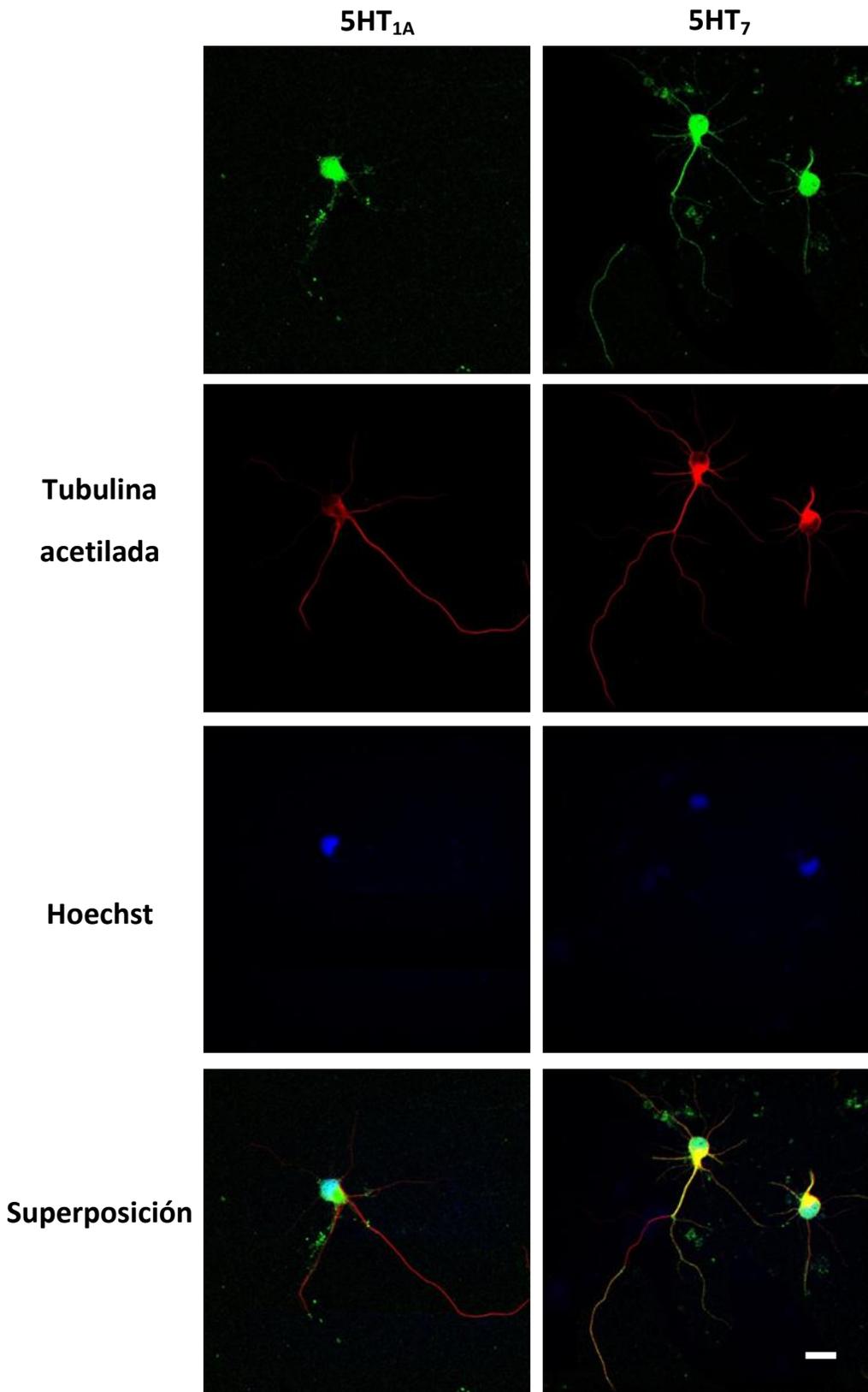
Con los resultados obtenidos podemos concluir que en nuestros cultivos se expresan ambos receptores serotoninérgicos y cuyos niveles no se modifican a la madurez de los cultivos utilizados en ensayos posteriores (2-7 DIV). La presencia de ambos receptores, fue una condición indispensable para los ensayos farmacológicos que involucran a los receptores serotoninérgicos de interés en esta Tesis. Sin embargo, fue relevante demostrar que estos receptores eran funcionales.



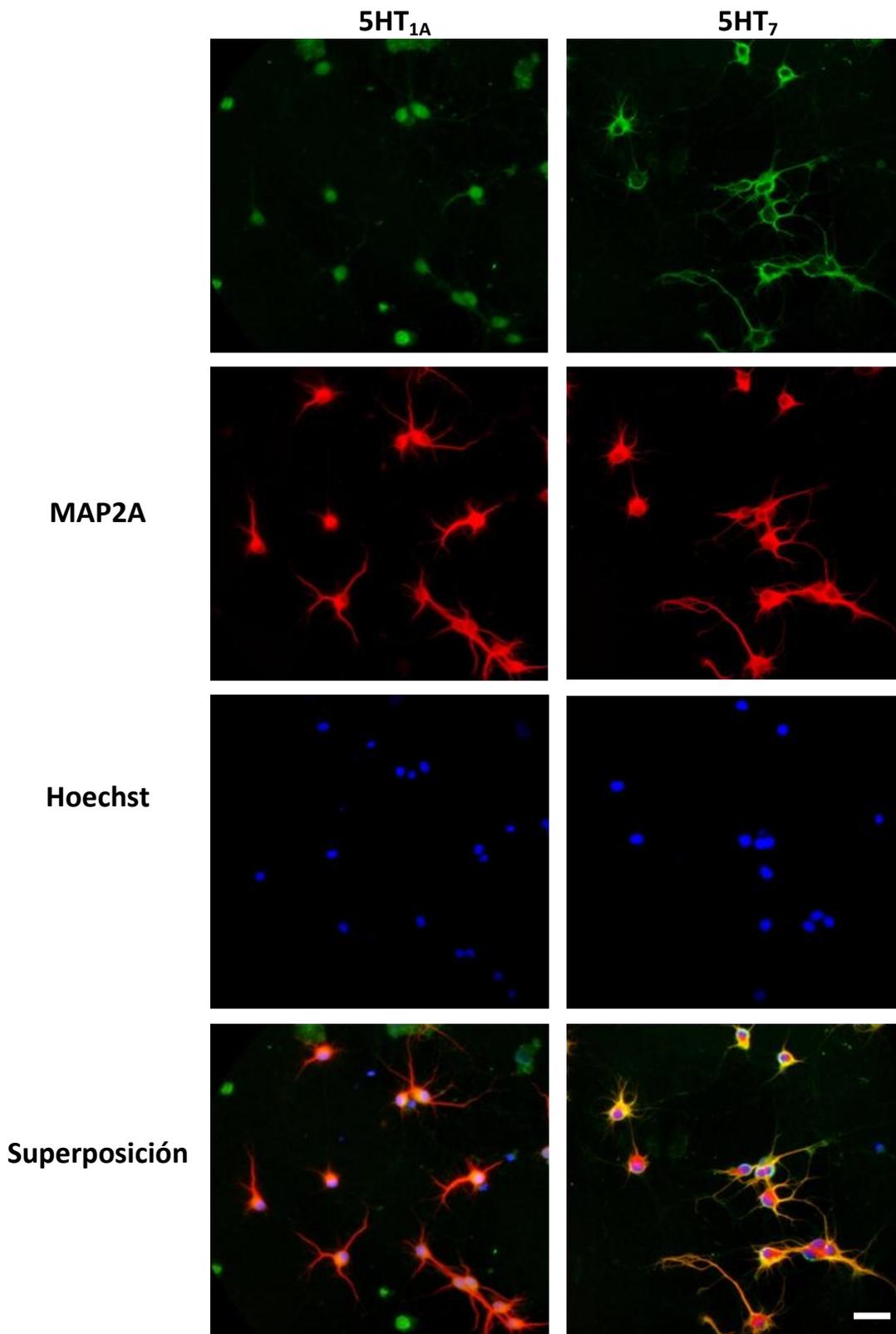
**Figura 13. Niveles del 5HT<sub>1A</sub>-R durante la evolución del cultivo mediante el análisis de Western.** Se obtuvieron extractos de proteínas totales a partir de cultivos con distintos días *in vitro*. (A) Muestra un inmunoblot representativo de las muestras. (B) Cuantificación de los niveles del 5HT<sub>1A</sub>-R respecto a los de β-actina. Los valores representan el promedio ± error estándar de la media, correspondientes a 6 cultivos independientes y cada muestra realizada en duplicado. Los datos se analizaron mediante test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Dunns ( $p > 0.05$ ).



**Figura 14. Niveles del 5HT<sub>7</sub>-R durante la evolución del cultivo mediante el análisis de Western.** Se obtuvieron extractos de proteínas totales a partir de cultivos con distintos días *in vitro*. (A) Muestra un inmunoblot representativo de cultivos. (B) Muestra la variación de ambas isoformas del receptor 5HT<sub>7</sub>-R durante la evolución del cultivo. Los datos se analizaron mediante test no paramétrico de Kruskal-Wallis ( $p < 0.01$ ), seguido del post-test de Dunns.  $**p < 0.01$ , 2 vs 14 DIV. (C) Análisis de la razón de las isoformas del 5HT<sub>7</sub>-R (a) y (b). Los valores representan el promedio  $\pm$  error estándar de la media de 5 cultivos independientes y cada uno realizado en triplicado. Las variaciones de las isoformas 5HT<sub>7(a)}/5HT<sub>7(b)}</sub> se analizaron mediante test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Dunns ( $p > 0.05$ ).</sub>



**Figura 15. Distribución de los receptores serotoninérgicos 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>7</sub> en cultivos primarios hipocámpales mediante el análisis por inmunocitoquímica a los 4 DIV.** Las neuronas se fijaron e inmuno tiñeron para tubulina acetilada (marcador de microtúbulos estables) y para detectar la presencia y distribución de los receptores 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>7</sub>. La imágenes se obtuvieron en un microscopio de epifluorescencia (Zeiss, Axioscop 20, Alemania) y utilizando el objetivo 40X. La barra representa 50 μm.



**Figura 16. Distribución de los receptores serotoninérgicos 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>7</sub> en cultivos primarios hipocampales mediante el análisis por inmunocitoquímica a los 8 DIV.** Las neuronas se cultivaron durante 8 días y posteriormente se fijaron e inmuno tiñeron con MAP2A (marcador dendrítico) y para los 5HT<sub>1A</sub>-R y 5HT<sub>7</sub>-R. Ambos receptores están presentes en los mismos procesos que el marcador dendrítico MAP2A. Se utilizó un microscopio de epifluorescencia (Zeiss, Axioscop 20, Alemania) utilizando el objetivo 40X. La barra representa 50  $\mu$ m.

### 5.3 Determinación de la concentración y temporalidad de los estímulos con agonista serotoninérgico 8OH-DPAT a los 2 DIV

Con el objetivo de determinar la concentración y el tiempo adecuado del estímulo de neuronas hipocampales con el agonista serotoninérgico 8OH-DPAT, se midió la activación de cascadas transduccionales involucradas con la regulación del citoesqueleto neuronal, a través de la determinación semicuantitativa de los niveles fosforilados de las proteínas de interés. Se determinó la fosforilación de la Akt en Ser<sup>473</sup>, necesaria para la activación completa de la quinasa, la fosforilación de la GSK-3 $\beta$  en Ser<sup>9</sup>; que inactiva a la quinasa y permite la estabilización de microtúbulos y la fosforilación de la cofilina en Ser<sup>3</sup>, que permite la elongación de los filamentos de actina por la inactivación de la proteína.

El 8OH-DPAT es un fármaco agonista con alta afinidad por el 5HT<sub>1A</sub>-R y de moderada afinidad por el 5HT<sub>7</sub>-R (Ruat y cols., 1993) (Tabla 2). Ambos receptores han sido involucrados en la regulación de vías que controlan el citoesqueleto neuronal (Li y cols., 2004; Cowen y cols., 2005). La activación del 5HT<sub>1A</sub>-R se ha asociado con la vía PI3K-Akt-GSK-3 $\beta$ , y se ha sugerido un rol en el crecimiento dendrítico (Naska y cols., 2006). Más aún, el estímulo con serotonina o agonistas de receptores serotoninérgicos como el 8OH-DPAT aumentan la actividad de la Akt en cultivo de neuronas hipocampales, efecto atribuido al 5HT<sub>1A</sub>-R (Cowen y cols., 2005).

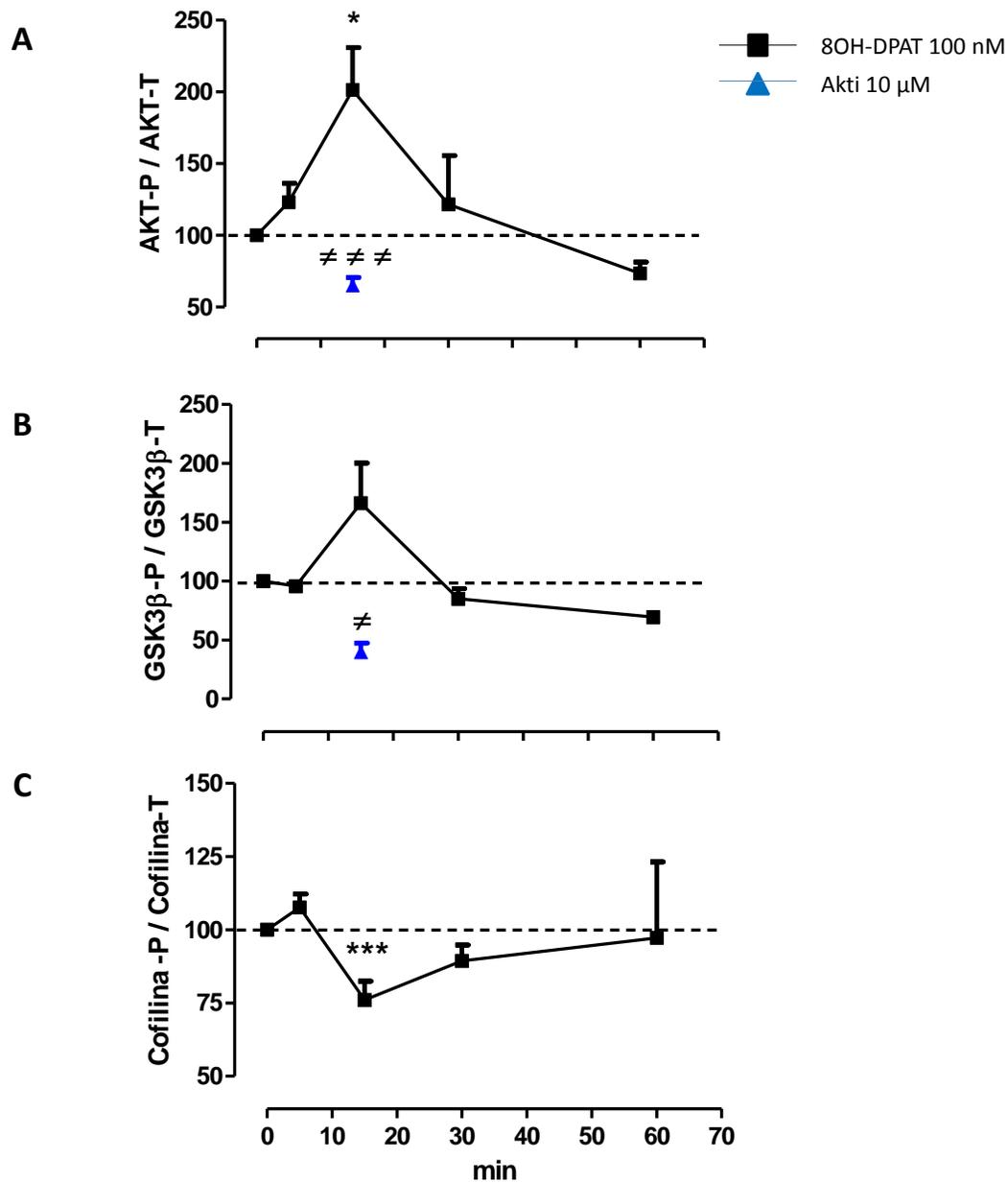
Con la finalidad de determinar tiempos óptimos de estimulación, se utilizó 8OH-DPAT 100 nM y se incubó entre 0-60 min. La Figura 17 A muestra que la estimulación a los 2 DIV produce un incremento en los niveles de la Akt fosforilada; siendo este incremento significativo a los 15 min. El aumento en los niveles de la Akt-p se relaciona con una tendencia al incremento de los niveles fosforilados de la GSK-3 $\beta$  (Figura 17 B). Sin embargo, se observó una alta variación en los datos probablemente debido a una alta actividad basal de la Akt. En apoyo a esta idea, la adición del inhibidor Akti disminuyó la fosforilación por bajo el nivel basal de ambas quinasas; aproximadamente en un 50 % de la fosforilación basal.

Por otro lado, se observa una disminución significativa en los niveles de la cofilina fosforilada a los 15 min de estímulo con 8-OH-DPAT 100 nM; efecto que se recupera entre los 30-60 min post estimulación (Figura 17 C). Los resultados anteriores muestran que los cultivos a los 2 DIV responden frente a los estímulos con un agonista serotoninérgico, sin establecer la contribución de los receptores 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>7</sub> en los efectos observados.

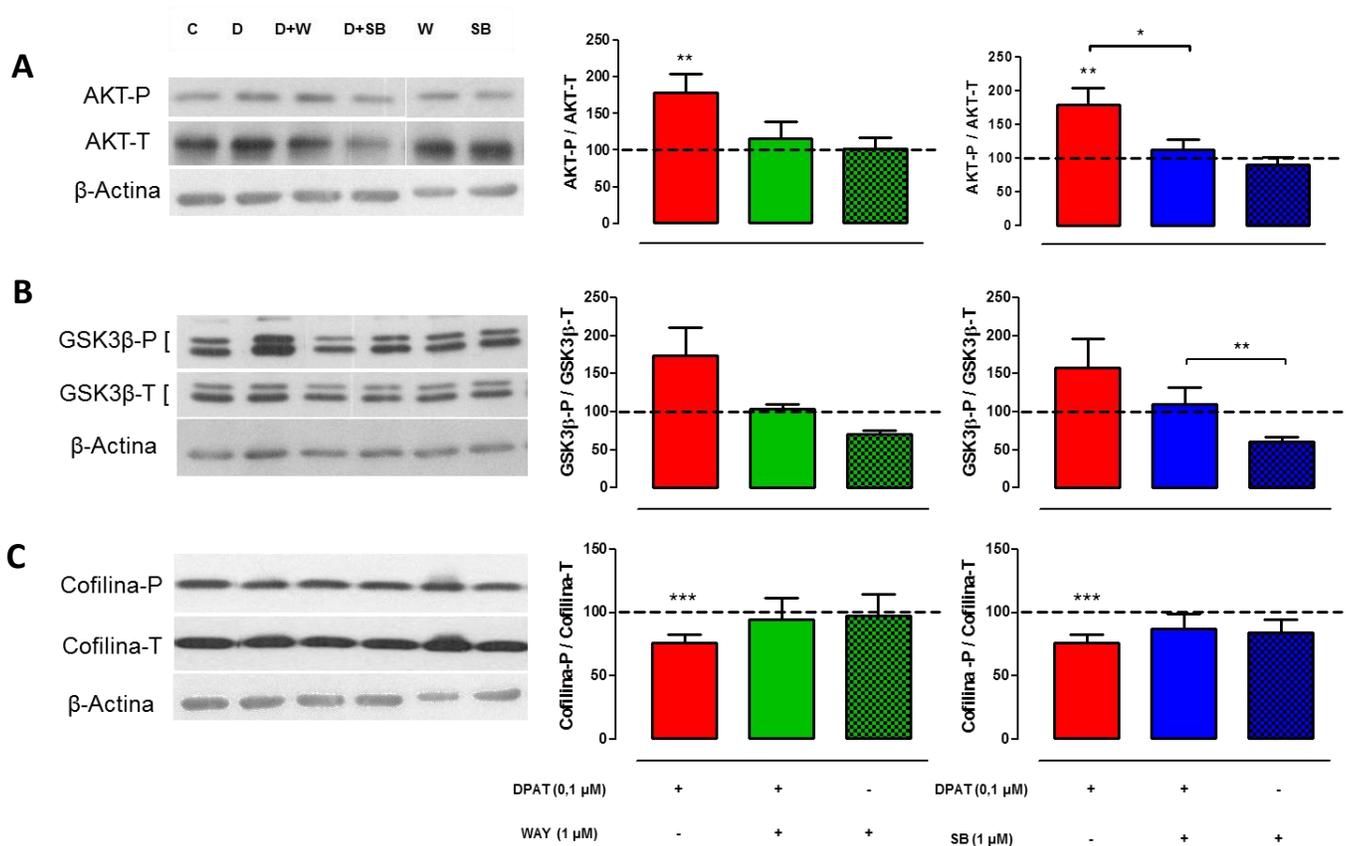
### 5.3.1 *Efectos de los antagonistas serotoninérgicos sobre el estímulo con 8OH-DPAT en cultivo de hipocampo de rata a los 2 DIV*

Dado que el 8OH-DPAT no solo activa al 5HT<sub>1A</sub>-R sino que también al 5HT<sub>7</sub>-R, se determinó la contribución de estos receptores sobre la vía Akt-GSK-3 $\beta$  y cofilina. Para ello se realizaron estímulos durante 15 min con 100 nM del agonista y en presencia y ausencia de 1  $\mu$ M de WAY-100635 y SB269970; antagonistas descritos para los receptores 5HT<sub>1A</sub> y el 5HT<sub>7</sub>, respectivamente. En la Figura 18 se observa un aumento en los niveles fosforilados de la Akt (Ser<sup>473</sup>), efecto que se reduce por la presencia de 1  $\mu$ M de ambos antagonistas; siendo significativo con el antagonista del 5HT<sub>7</sub>-R (Figura 18 A). Adicionalmente, se observó con 8OH-DPAT 100 nM un aumento variable en los niveles fosforilados de la GSK-3 $\beta$  (fosforilación inactivante de la proteína, Serina<sup>9</sup>), efecto que no fue antagonizado significativamente por la presencia de ambos antagonistas (Figura 18 B). Interesantemente, la adición de SB269970, antagonista del 5HT<sub>7</sub>-R, disminuye significativamente los niveles de GSK-3 $\beta$ -p, lo que sugiere una activación basal del receptor. Contrariamente, el estímulo con 8OH-DPAT disminuye los niveles de la cofilina fosforilada en Serina<sup>3</sup>, efecto no prevenido significativamente por los antagonistas. (Figura 18 C).

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos concluir que la vía Akt-GSK3 $\beta$ , tiene un nivel de activación basal en el cultivo a los 2 DIV y que la adición del agonista 8OH-DPAT promueve un aumento significativo en la fosforilación de la Akt en el cual contribuiría en forma significativa la activación del 5HT<sub>7</sub>-R. Por otro lado, se demuestra que la presencia de este agonista reduce la fosforilación de la cofilina aunque no se pudo precisar el receptor involucrado.



**Figura 17. Temporalidad del cambio en el estado de la fosforilación de Akt, GSK-3β y cofilina promovida por el agonista 8OH-DPAT.** Los cultivos a los 2 DIV se estimularon con 100 nM de 8OH-DPAT durante 0-60 min. Los valores están expresados en porcentajes con respecto al control. Los datos se analizaron mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y post-test de Dunns. (A) Variación de los niveles de la Akt-p en respuesta al 8OH-DPAT. Control vs 8OH-DPAT 100 nM, ( $p < 0,05$ ) post-test \* $p < 0,05$ . 8OH-DPAT vs 8OH-DPAT + Akti, ( $p < 0,001$ ) post-test <sup>##</sup> $p < 0,001$ . (B) Variación de los niveles de la GSK-3β en respuesta al agonista, ( $p > 0,05$ ). 8OH-DPAT vs 8OH-DPAT + Akti, ( $p < 0,05$ ) post-test <sup>≠</sup> $p < 0,05$  (C) Variación de los niveles de la cofilina-p en respuesta al agonista. Control vs 8OH-DPAT 100 nM, ( $p < 0,01$ ) post-test \*\*\* $p < 0,001$ .



**Figura 18. Efecto de los antagonistas WAY-100635 y SB269970 sobre los cambios en el estado de fosforilación de Akt, GSK-3β y cofilina promovida por el 8OH-DPAT a los 2 DIV.** Las células se estimularon durante 15 min con 8OH-DPAT 100 nM en ausencia y presencia de 1 μM de los antagonistas WAY-100635 y SB269970. Los valores se normalizaron respecto al control (sin estímulo) y representan el promedio ± E.E.M. de 5 cultivos independientes. Para múltiples comparaciones se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y post-test de Dunns. Para determinar el efecto sobre el control se realizó el análisis de t test de datos pareados.

(A) Variación de los niveles de Akt-p en respuesta al agonista y antagonistas.  
Control vs 8OH-DPAT, ( $p < 0,01$ ), t-test  $**p < 0,01$   
8OH-DPAT vs 8OH-DPAT + SB269970, ( $p < 0,01$ ), post-test  $*p < 0,05$

(B) Variación de los niveles de GSK-3β-p en respuesta al agonista y antagonistas.  
( $p > 0,05$ ). Control vs SB269970, ( $p < 0,01$ ), t-test  $**p < 0,01$

(C) Variación de los niveles de la cofilina-p en respuesta al agonista y antagonistas.  
control vs 8OH-DPAT 100 nM, ( $p < 0,01$ ) t-test  $***p < 0,001$ .

C= control, D=8OH-DPAT, D+W= 8OH-DPAT+WAY-100635, D+SB= 8OH-DPAT+SB269970, W=WAY-100635, SB= SB269970.

#### 5.4 Efectos de los agonistas serotoninérgicos sobre la morfología de neuritas a los 3 DIV

Los resultados anteriores demuestran que el 8OH-DPAT activa los receptores serotoninérgico a este estadio del cultivo. Por lo tanto, en la sección siguiente se relacionará si la activación de receptores serotoninérgicos promueve cambios en la morfología neuronal. Existen antecedentes de que la reducción aguda de los niveles de serotonina produce una reducción en el crecimiento dendrítico (Yan y cols., 1997; Haring y cols., 1999) y por tanto, este efecto podría explicar la acción de los antidepresivos, que incrementan los niveles de serotonina, sobre la arborización dendrítica.

##### 5.4.1 *Efectos sobre la morfología neuronal del 8OH-DPAT y de los antagonistas WAY-100635 y SB269970*

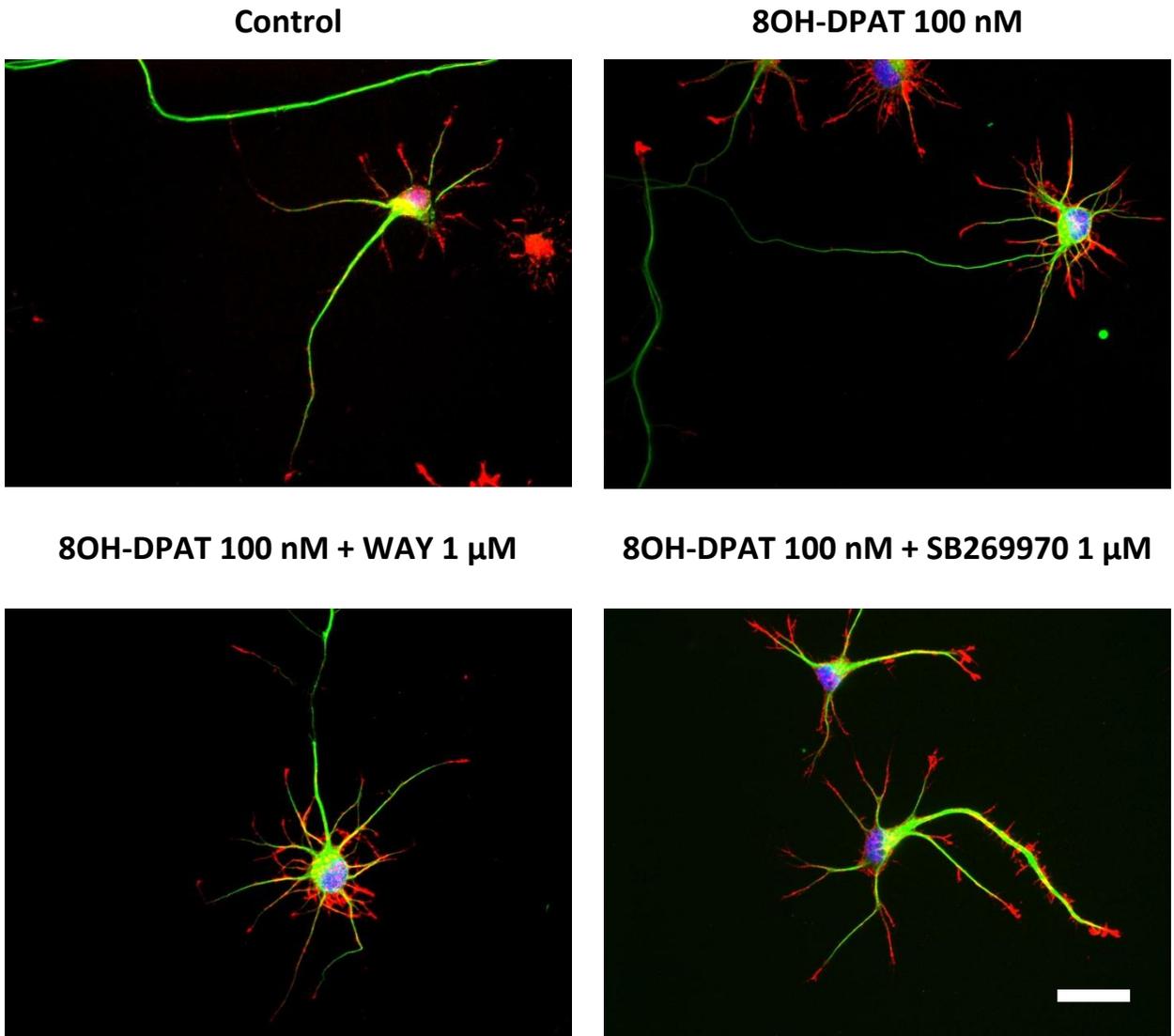
Se determinó si los agonistas serotoninérgicos provocan cambios en el desarrollo de neuritas. La Figura 19 muestra imágenes representativas de neuronas a los 3 DIV posterior a las 24 h de su incubación con 8OH-DPAT y en presencia y ausencia de los antagonistas. Las neuronas se marcaron para tubulina acetilada, que permite observar microtúbulos y el análisis consideró aquellas proyecciones que del punto de vista morfológico correspondían a neuritas, descartándose del análisis la proyección más larga de cada neurona. La adición del agonista induce un aumento del número de proyecciones; efecto que no es prevenido por WAY-100635 y SB269970. Para realizar un análisis cuantitativo se realizó el análisis de Sholl, que permite determinar cambios en la complejidad de la morfología neuronal. Se observó que la adición del 8OH-DPAT durante 24 h en neuronas a los 2 DIV aumenta la complejidad neuronal respecto al control en las 10 primeras micras desde el soma, sin observarse cambios a mayores distancias desde el soma (Figura 20). Esto sugiere que el 8OH-DPAT aumenta la aparición de neuritas primarias; efecto que no estaría mediado por la activación de los receptores 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>7</sub> puesto que no fue prevenido por los antagonistas para dichos receptores (WAY-100635 y SB269970, respectivamente) (Figura 20 A-B). Adicionalmente, el SB269970 posterior a la adición de 8OH-DPAT, disminuye la complejidad entre 40-100  $\mu$ m, lo que sugiere que el 5HT<sub>7</sub>-R favorece un aumento de la

complejidad neuronal. Además se observa que ambos antagonista por sí solos no producen cambios en la complejidad dendrítica (ver inserto Figura 20). Para realizar un análisis mas acabado de la morfología, se realizó la cuantificación del número, largo total y largo promedio de las neuritas, tal como se describió en la metodología (Figura 6).

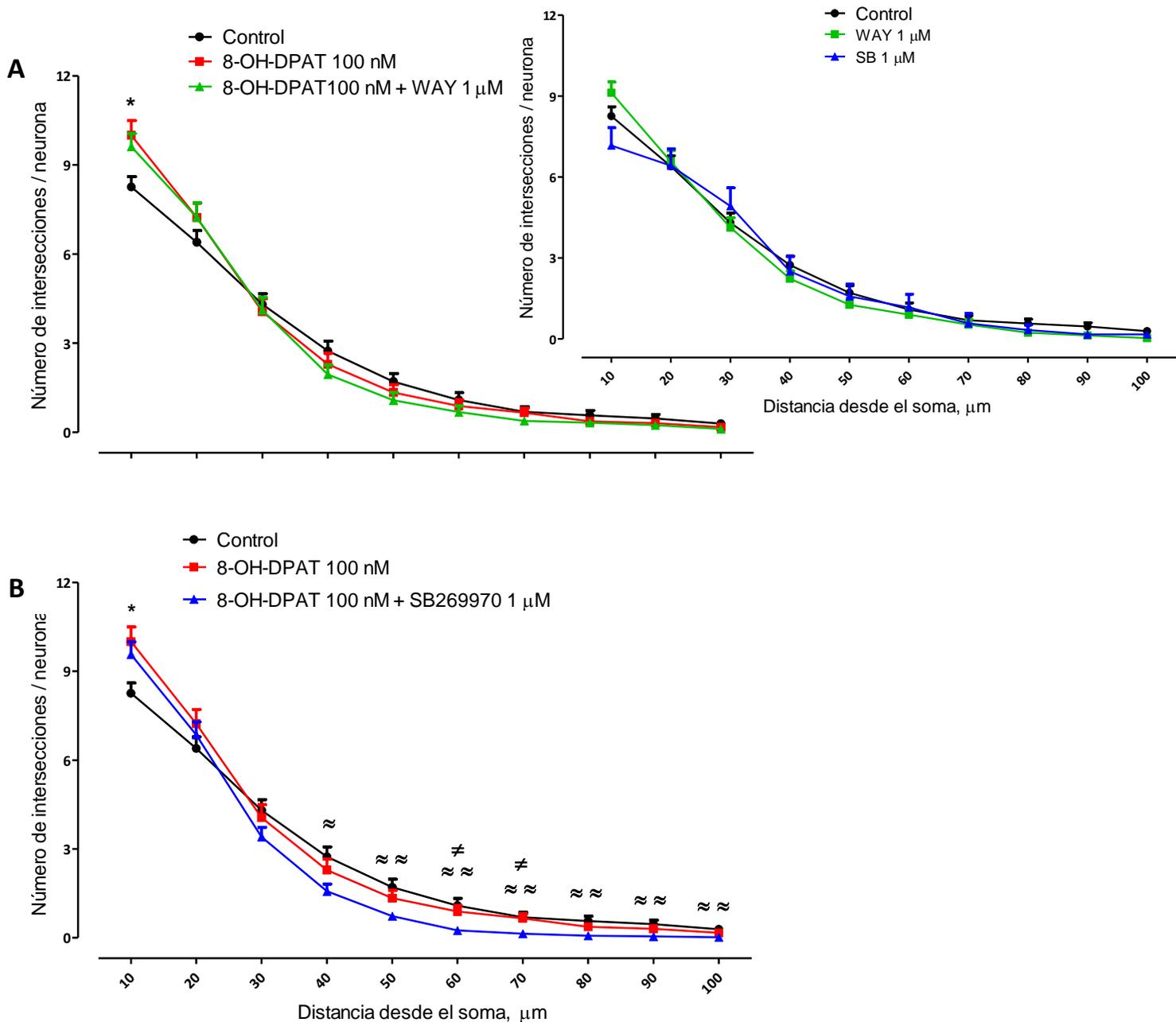
#### 5.4.2 Efecto del 8OH-DPAT sobre el número de neuritas

El estímulo con 8OH-DPAT aumenta significativamente el número de neuritas primarias (Figura 21), concordante con el análisis de Sholl. Este incremento del 43 % fundamentalmente se asocia a aquellas neuritas  $< 40 \mu\text{m}$  y no afecta las neuritas  $> 40 \mu\text{m}$ ; efecto que no es prevenido por los antagonistas serotoninérgicos.

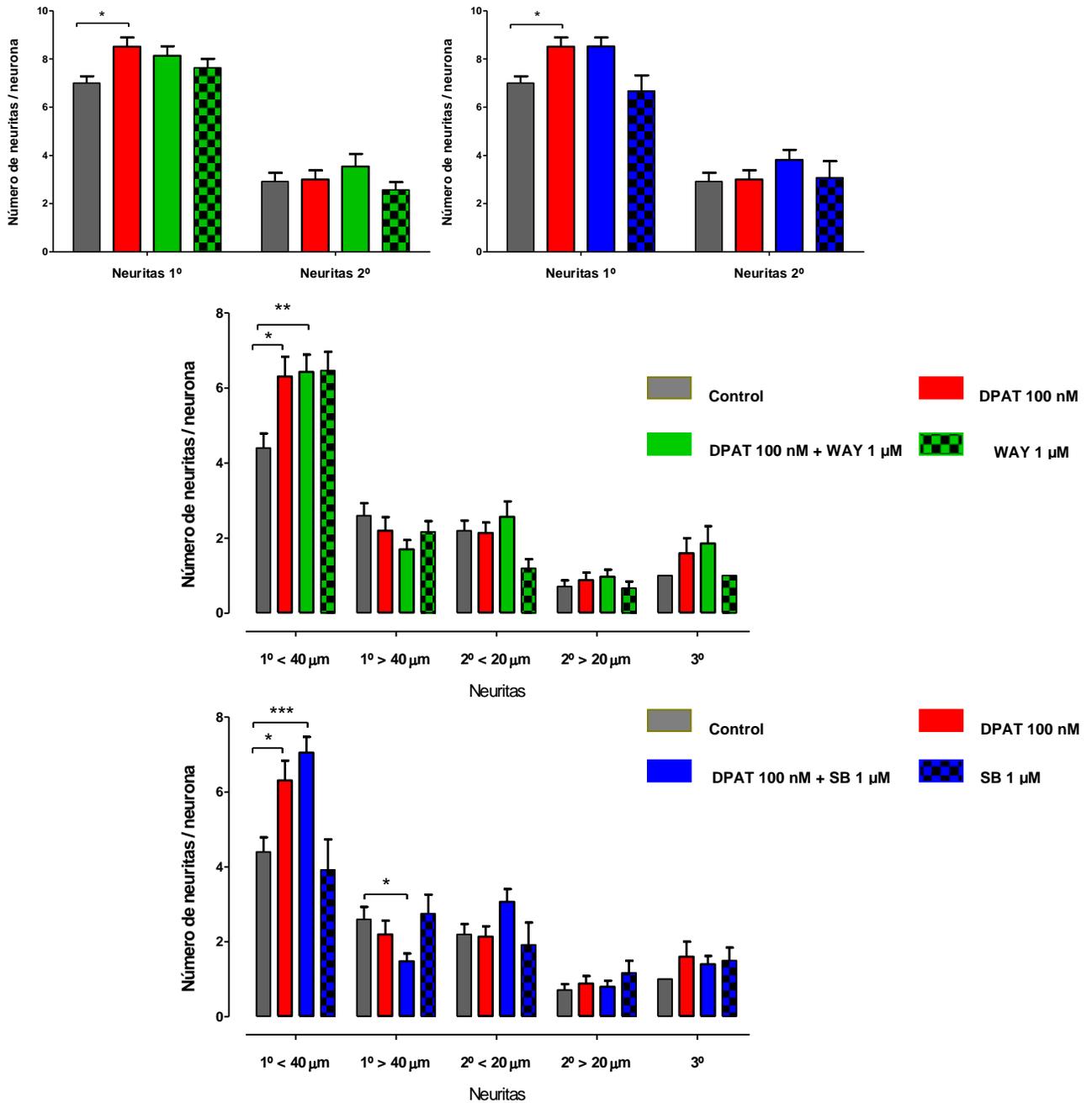
Estos resultados sugieren que los receptores  $5\text{HT}_{1A}$  y  $5\text{HT}_7$  no determinan el número de neuritas primarias  $< 40 \mu\text{m}$  y que el receptor involucrado solo afecta el número. En contraste, las neuritas mayores a  $40 \mu\text{m}$  y las neuritas secundarias no se afectan por la presencia de 8OH-DPAT. Sin embargo, se observó que el estímulo de 8OH-DPAT posterior al tratamiento con SB269970 provoca una disminución significativa en el número de neuritas primarias mayores a  $40 \mu\text{m}$  y un aumento significativo en el número de neuritas primarias menores a  $40 \mu\text{m}$  con respecto al control. Este efecto puede ser interpretado por la participación de más de un receptor serotoninérgico con acciones opuestas; y que de acuerdo a la disección farmacológica uno de ellos correspondería al  $5\text{HT}_7\text{-R}$ , cuya activación incrementa el número de dendritas primarias mayores a  $40 \mu\text{m}$ . Se observa que, ambos antagonistas no producen cambios en el número de neuritas.



**Figura 19. Imágenes representativas de neuronas con 3 DIV utilizadas para medición de la morfología de neuritas.** Las neuronas se cultivaron durante 2 días y posteriormente se estimularon por 24 h. A los 3 DIV se fijaron e inmuno tiñeron con tubulina acetilada (marcador de microtúbulos estables, fluorescencia verde) y con faloidina-rodamina (marcador de citoesqueleto de actina, fluorescencia roja), junto con la tinción nuclear Hoechst (fluorescencia azul). Se utilizó un microscopio confocal DSU, objetivo 40X. Los canales fueron integrados a través del programa ImageJ. La barra representa 50  $\mu$ m. Las neuronas cuantificadas corresponden a 2 cultivos independientes (control n=35; 8OH-DPAT 100 nM n=35; 8-OH-DPAT + WAY n=37 y 8OH-DPAT 100 nM + SB269970 1 $\mu$ M n=44).



**Figura 20. Efecto del 8OH-DPAT sobre la complejidad neuronal de cultivos primarios de hipocampo de rata 3 DIV.** Los cultivos se incubaron durante 24 h con 8OH-DPAT 100 nM. Los antagonistas WAY-100635 (A) y SB269970 (B) se agregaron 30 min previo al agonista. Las neuronas se fijaron e inmuno tiñeron contra tubulina acetilada y el citoesqueleto de F-actina se marcó con faloidina-rodamina. El número de intersecciones son entregadas por el programa Bonfire. Las neuronas cuantificadas corresponden a dos cultivos independientes (control n=35; 8OH-DPAT 100 nM n=35; 8OH-DPAT + WAY 1μM n=37 y 8OH-DPAT 100 nM + SB269970 1μM n=44). Los datos representan el promedio ± EEM. Inserto. Efectos de los antagonistas sobre la complejidad neuronal. Los datos fueron analizados mediante el test de ANOVA para cada condición y seguido del post-test de Bonferroni. Análisis de ANOVA A,  $p < 0,01$ ; B,  $p < 0,01$ . Post-test: \* = Control v/s 8OH-DPAT, ≠ = 8OH-DPAT v/s 8OH-DPAT + SB269970, ≈ = Control v/s 8-OH-DPAT + SB269970. \* $p < 0,05$ , ≠  $p < 0,05$ , ≈ ≈  $p < 0,01$ , ≈  $p < 0,05$ .

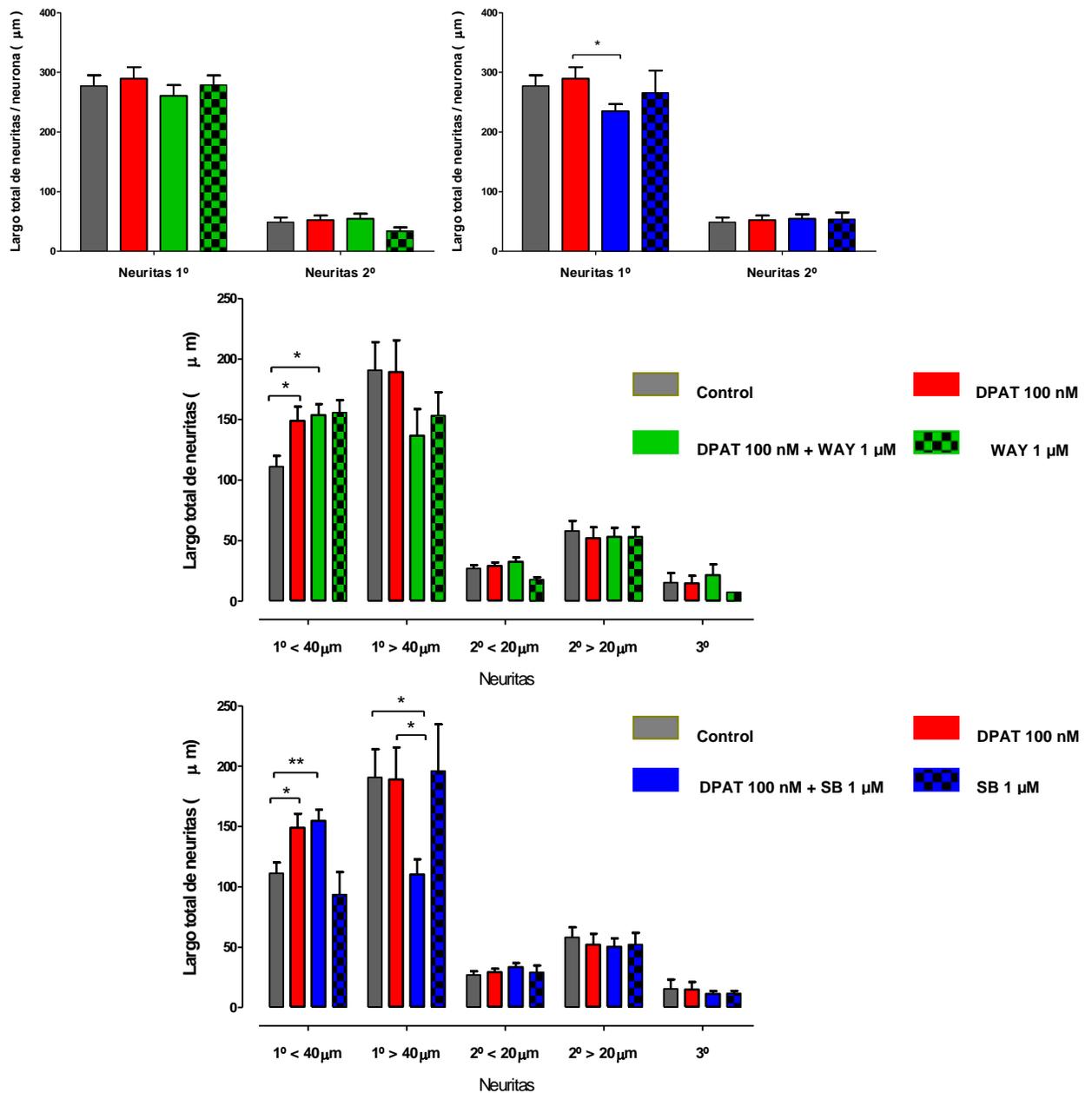


**Figura 21. Efecto de la estimulación con 8OH-DPAT sobre el número de neuritas primarias, secundarias y terciarias por neurona a los 3 DIV.** Las neuronas a los 2 DIV se incubaron durante 24 h con 8OH-DPAT 100 nM. Los antagonistas WAY y SB269970 se agregaron 30 min previo al agonista. Las neuronas se fijaron e inmuno tiñeron contra tubulina acetilada y el citoesqueleto de F-actina se marcó con faloidina-rodamina. Las neuronas cuantificadas corresponden a dos cultivos independientes (control n=35; 8OH-DPAT 100 nM n=35; 8OH-DPAT + WAY n=37 y 8OH-DPAT 100 nM + SB269970 1μM n=44). Los valores del número de neuritas son entregados por el programa NeuronJ. Los datos representan el promedio ± EEM. Los datos fueron analizados mediante el test de ANOVA para cada condición y seguido del post-test de Bonferroni. \*\*\* p<0,001, \*\* p < 0,01, \* < p 0,05.

#### 5.4.3 Efecto del 8OH-DPAT sobre el largo total y promedio de neuritas

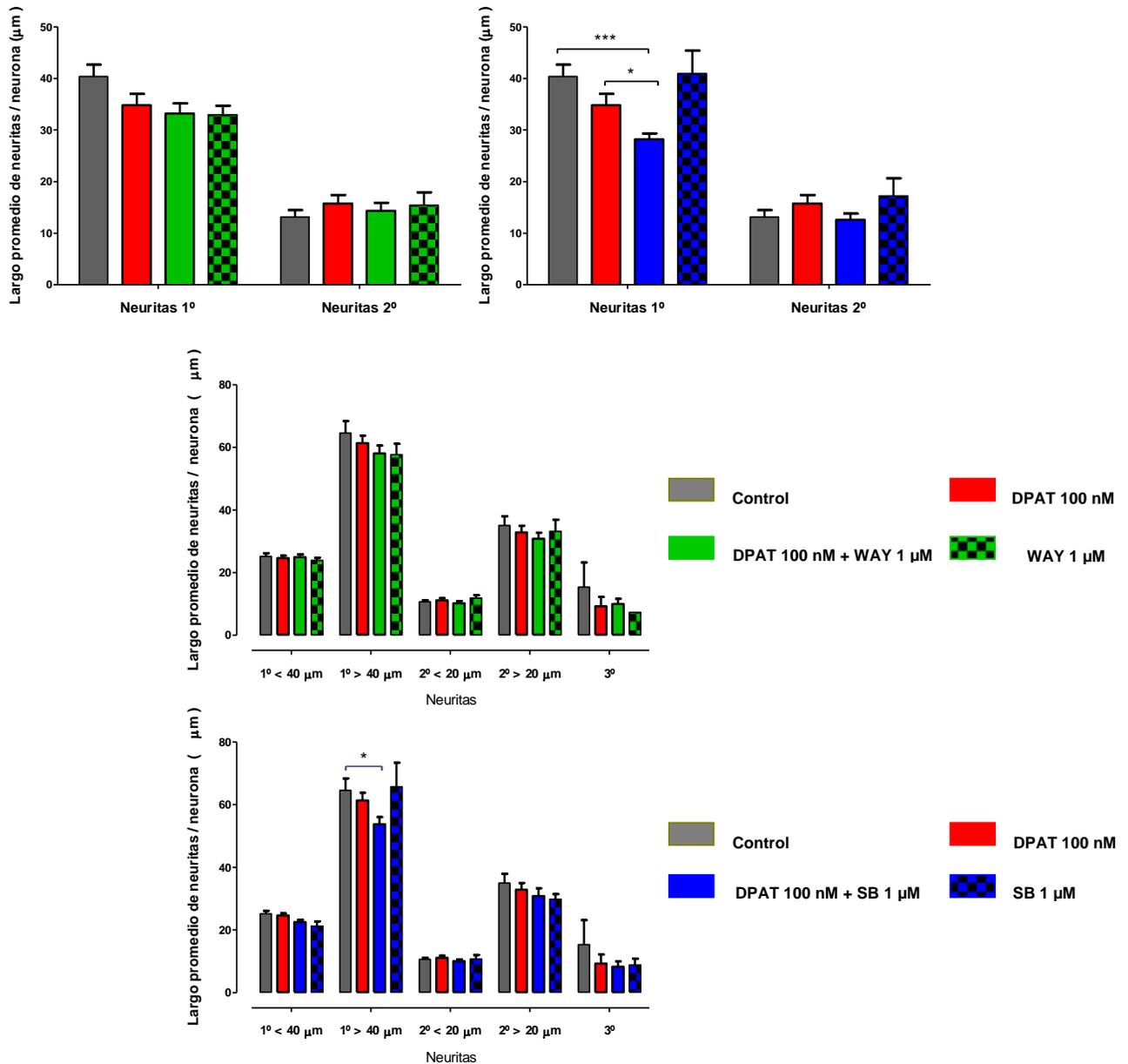
El largo total de neuritas primarias y secundarias no cambian frente al estímulo con 8OH-DPAT. A diferencia del WAY-100635, la adición conjunta de 8OH-DPAT con SB269970, produce una reducción en un 15 % del largo total de neuritas primarias (Figura 22). Al realizar este análisis mediante la segregación de las neuritas de acuerdo al largo, se observa que el estímulo con 8OH-DPAT aumenta significativamente (34 %) el largo total de neuritas primarias menores a 40  $\mu\text{m}$ . Este efecto no es prevenido por ambos antagonistas. En contraste, en presencia de 8OH-DPAT en conjunto a SB269970, se observó una disminución significativa del largo total de neuritas mayores a 40  $\mu\text{m}$  con respecto al control (Figura 22). Este efecto, es decir la reducción en el largo total de neuritas primarias es producto de la disminución del número de dendritas observadas. Por otra parte, no se observó en ningún caso cambios en el largo total de neuritas secundarias. El estímulo con 8OH-DPAT no provoca cambio en el largo promedio de neuritas primarias y secundarias. Sin embargo, el estímulo de 8OH-DPAT posterior a SB269970 disminuye significativamente el largo promedio de neuritas primarias más largas ( $> 40 \mu\text{m}$ ) (Figura 23).

De acuerdo a nuestros resultados el 8OH-DPAT actúa sobre más de un receptor, es por ello que se decidió utilizar la 5-HT como un agonista más amplio de los receptores serotoninérgicos y mediante el uso de antagonistas específicos discernir la contribución de los receptores 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>7</sub> sobre la morfología.



**Figura 22. Efecto de la estimulación con 8OH-DPAT sobre el largo total de neuritas por neurona a los 3 DIV.** Las neuronas a los 2 DIV se incubaron durante 24 h con 8OH-DPAT 100 nM. Los antagonistas WAY y SB se agregaron 30 min previo al agonista. Las neuronas se fijaron e inmuno tiñeron contra tubulina acetilada y el citoesqueleto de F-actina se marcó con faloidina-rodamina. Para determinar el largo de neuritas total, se sumó el largo de las neuritas primarias, secundarias y terciarias de cada neurona. Las neuronas cuantificadas corresponden a dos cultivos independientes (control n=35; 8OH-DPAT 100 nM n=35; 8OH-DPAT + WAY n=37 y 8OH-DPAT 100 nM + SB269970 1µM n=44). Los valores del largo dendrítico son entregados por el programa NeuronJ. Los datos representan el promedio  $\pm$  EEM. Los datos fueron analizados mediante el test de ANOVA para cada condición y seguido del post-test de Bonferroni.

\*\* p<0,01, \*p<0,05.

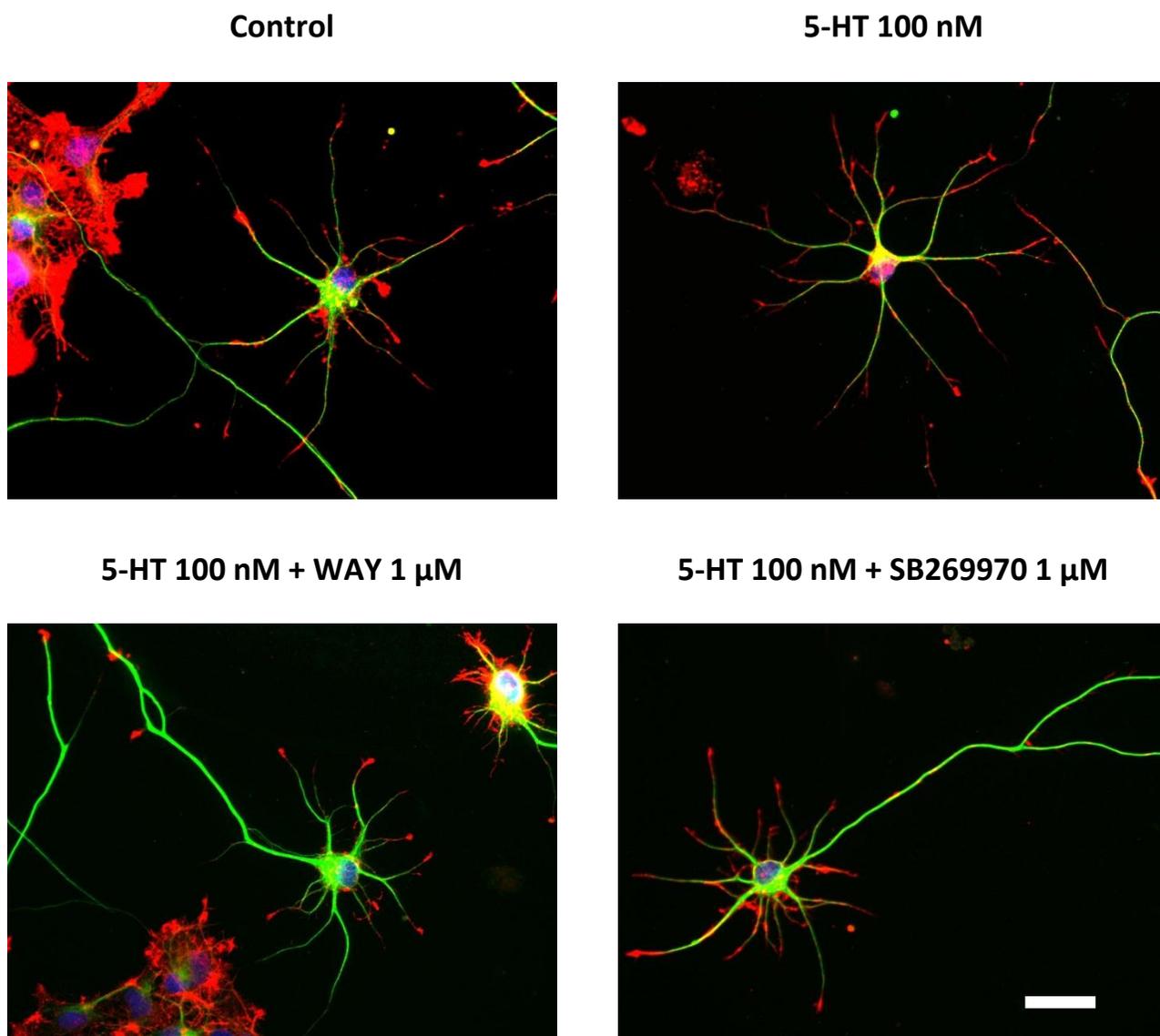


**Figura 23. Efecto de la estimulación con 8OH-DPAT sobre el largo promedio de neuritas por neurona a los 3 DIV.** Las neuronas a los 2 DIV se incubaron durante 24 h con 8OH-DPAT 100 nM. Los antagonistas WAY y SB se agregaron 30 min previo al agonista. Las neuronas se fijaron e inmuno tiñeron contra tubulina acetilada y el citoesqueleto de F-actina fue marcado con faloidina- rodamina. Para determinar el largo de neuritas promedio, se sumó el largo de las neuritas primarias, secundarias y terciarias de cada neurona y se dividió por el número de neuritas. Las neuronas cuantificadas corresponden a dos cultivos independientes (control n=35; 8-OH-DPAT 100 nM n=35; 8-OH-DPAT + WAY n=37 y 8-OH-DPAT 100 nM + SB269970 1µM n=44). Los valores del largo de neuritas son entregados por el programa NeuronJ. Los datos representan el promedio ± EEM. Los datos se analizaron mediante el test de ANOVA para cada condición y seguido del post-test de Bonferroni. \*\*\* p< 0,001, \*p< 0,05.

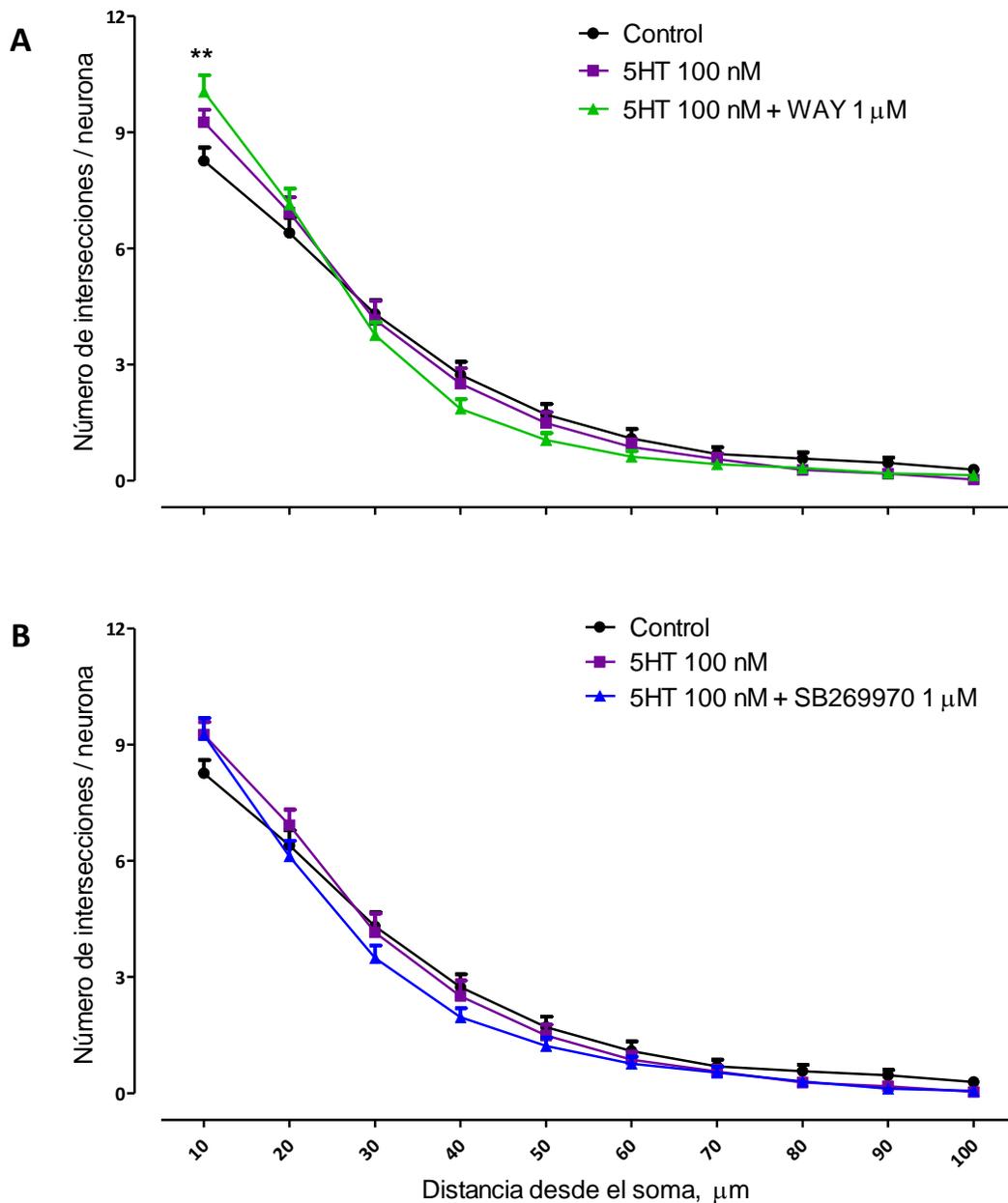
#### 5.4.4 *Efectos sobre la morfología neuronal de la serotonina y de los antagonistas WAY-100635 y SB269970*

La Figura 24 muestra imágenes representativas de neuronas a los 3 DIV posterior a las 24 h de su incubación con serotonina y los antagonistas WAY-100635 y SB269970. Estas neuronas se marcaron con anticuerpos para tubulina acetilada y faloidina rodamina. El estímulo con serotonina no provoca cambios en el número de ramificaciones. En cambio la serotonina promueve un aumento del número de neuritas primarias cuando los receptores 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>7</sub> han sido previamente antagonizados.

El análisis de Sholl mostró que a diferencia de lo observado con 8OH-DPAT, el estímulo con serotonina no cambia la complejidad de neuritas respecto al control en las 10 primeras micras desde el soma. Sin embargo, la adición de serotonina posterior al WAY-100635 aumenta significativamente el número de intersecciones en las 10  $\mu\text{m}$  desde el soma con respecto al control (Figura 25), que correspondería a un aumento del número de neuritas primarias, sugiriendo que la activación del 5HT<sub>1A</sub>-R promueve una disminución este parámetro. Esto sugiere que la serotonina activa a receptores con efectos opuestos sobre la morfología neuronal. De forma similar, la adición de serotonina posterior al bloqueo con el antagonista SB269970 no produce cambios en el número de neuritas primarias (Figura 25).



**Figura 24. Imágenes representativas de neuronas con 3 DIV utilizadas para medición de morfología de neuritas.** Las neuronas se cultivaron durante 2 días y posteriormente se estimularon por 24 horas. A los 3 DIV se fijaron e inmuno tiñeron con tubulina acetilada (marcador de microtúbulos estables, fluorescencia verde) y con faloidina-rodamina (marcador de citoesqueleto de actina, fluorescencia roja), junto con la tinción nuclear Hoechst (fluorescencia azul). Se utilizó un microscopio confocal DSU, objetivo 40X. Los canales fueron integrados a través del programa ImageJ. La barra representa 50  $\mu\text{m}$ . Las neuronas cuantificadas corresponden a 2 cultivos independientes (control  $n=35$ , 5HT 100 nM  $n=39$ , 5HT 100 nM + WAY 1  $\mu\text{M}$   $n=51$ , y 5HT 100 nM + SB269970 1 $\mu\text{M}$   $n=51$ ).

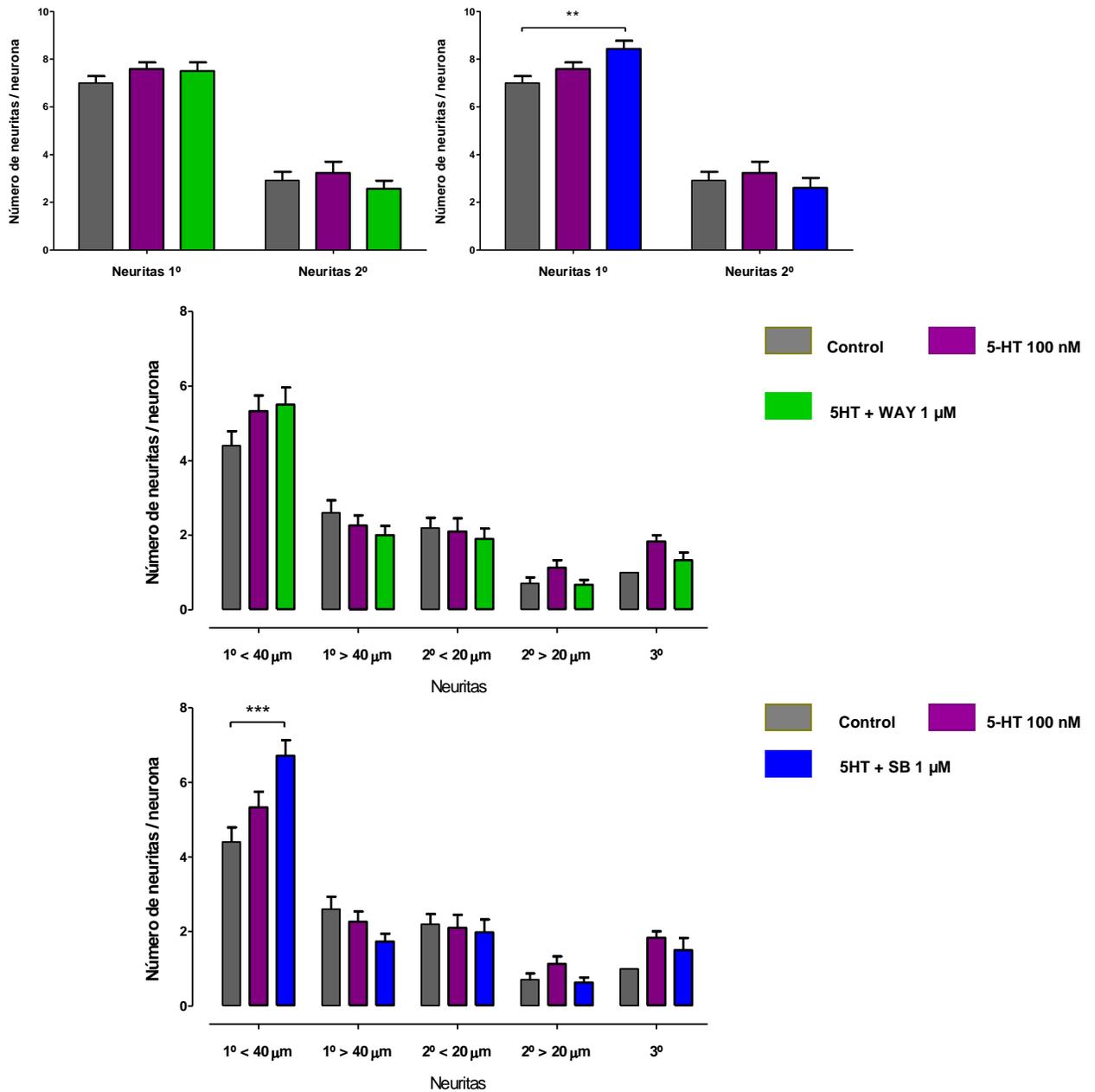


**Figura 25. Efecto de la 5-HT sobre la complejidad neuronal de cultivos primarios de hipocampo de rata 3 DIV.** Los cultivos se incubaron durante 24 h con 5-HT 100 nM. Los antagonistas WAY (A) y SB269970 (B) se agregaron 30 min previo al agonista. Las neuronas se fijaron e inmuno tiñeron contra tubulina acetilada y el citoesqueleto de F-actina se marcó con faloidina-rodamina. El número de intersecciones son entregadas por el programa Bonfire. Las neuronas cuantificadas corresponden a dos cultivos independientes (control n=35, 5-HT 100 nM n=39, 5-HT 100 nM + WAY 1  $\mu\text{M}$  n=51, y 5-HT 100 nM + SB269970 1 $\mu\text{M}$  n=51). Los datos representan el promedio  $\pm$  EEM. Los datos fueron analizados mediante el test de ANOVA para cada condición y seguido del post-test de Bonferroni. Análisis de ANOVA, A,  $p < 0,001$ ; B,  $p < 0,01$ . Post-test: \*= control v/s 5HT + WAY.

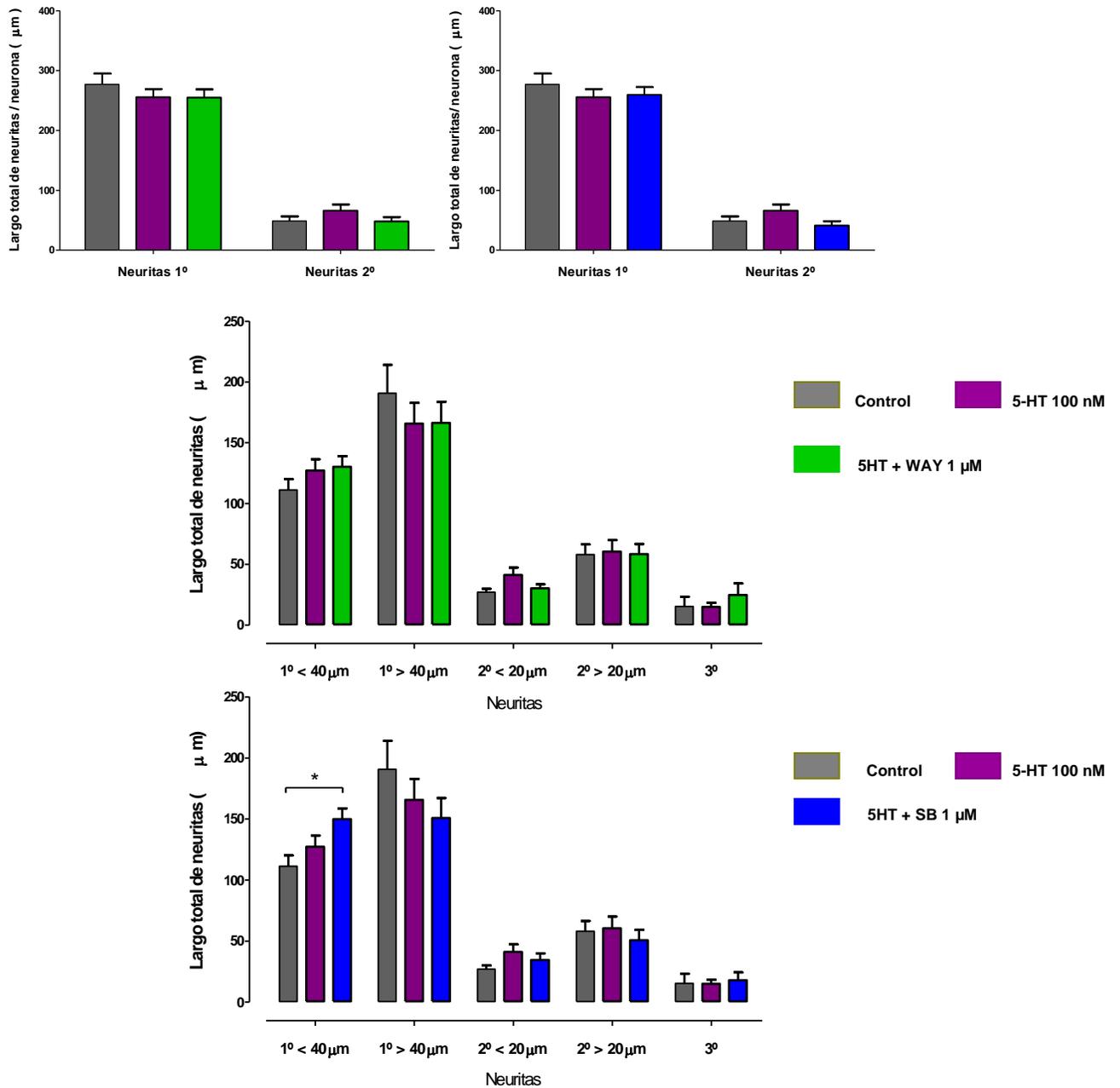
#### 5.4.5 Efecto de la serotonina sobre el número de neuritas, largo total y largo promedio

La adición de serotonina no produce cambios en el número de neuritas primarias y secundarias. Sin embargo, el estímulo de serotonina posterior a SB269970 (y no con WAY-100635), produce un aumento significativo solo en el número de neuritas primarias menores a 40  $\mu\text{m}$  con respecto al control (Figura 26); este resultado es consistente con el efecto observado bajo la estimulación de 8OH-DPAT con SB269970. Esto apoya la idea de que el 8OH-DPAT y la serotonina activan simultáneamente receptores con efectos opuestos y que la activación del 5HT<sub>7</sub>-R tiene como consecuencia la disminución del número de neuritas primarias. La serotonina no provoca cambios en el largo total de neuritas primarias y secundarias, analizadas en forma global como segregadas por el largo. No obstante, el estímulo de serotonina en presencia de SB269970 aumenta el largo de total de las neuritas primarias menores a 40  $\mu\text{m}$ ; efecto no remedado por la presencia de WAY-100635 (Figura 27).

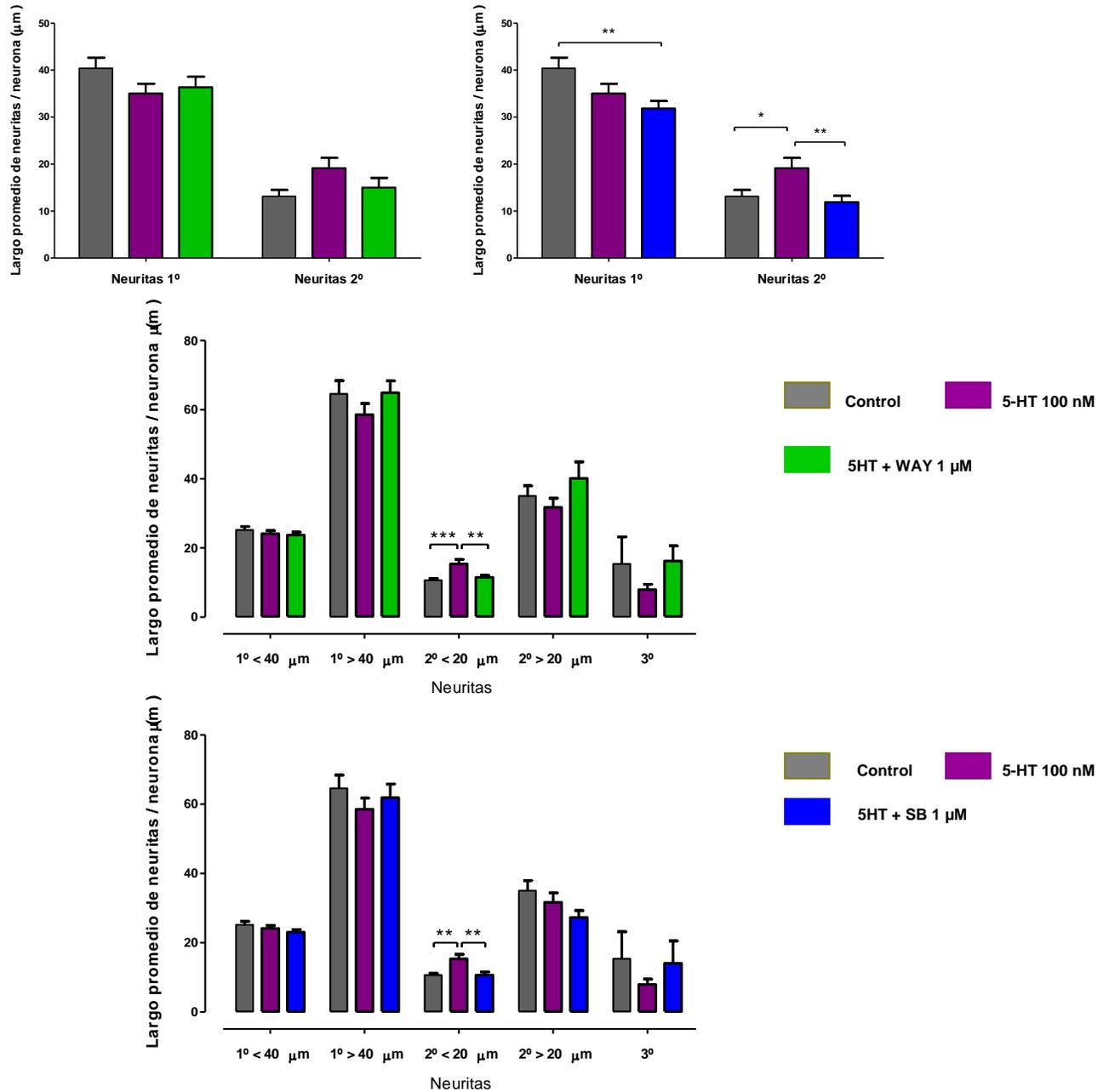
La serotonina produce una disminución, aunque no significativa, en el largo promedio de las neuritas primarias (Figura 28). Más aún, la adición de serotonina posterior a la adición de SB269970 disminuye en aproximadamente en un 25% el largo dendrítico promedio de forma similar, aunque de menor magnitud, a lo observado con el estímulo de 8OH-DPAT posterior a la adición de SB269970. Aunque no se observaron cambios en el número de dendritas secundarias, la adición de serotonina aumenta significativamente el largo promedio, efecto asociado a aquellas neuritas secundarias menores a 20  $\mu\text{m}$ . Este efecto es reducido por la presencia de WAY-100635 y de SB269970 (Figura 28).



**Figura 26. Efecto de la estimulación con 5-HT sobre el número de neuritas primarias, secundarias y terciarias por neurona a los 3 DIV.** Las neuronas a los 2 DIV se incubaron durante 24 h con 5HT 100 nM. Los antagonistas WAY y SB se agregaron 30 min previo al agonista. Las neuronas se fijaron e inmuno tiñeron contra tubulina acetilada y el citoesqueleto de F-actina fue marcado con faloidina-rodamina. Las neuronas cuantificadas corresponden a dos cultivos independientes (control n=35; 5HT 100 nM n=39; 5HT + WAY n=42 y 5HT 100 nM + SB269970 1μM n=51). Los valores del número de neuritas son entregados por el programa NeuronJ. Los datos representan el promedio ± EEM. Los datos se analizaron mediante el test de ANOVA para cada condición y seguido del post-test de Bonferroni. \*\*\* p<0,001, \*\* p < 0,01.



**Figura 27. Efecto de la estimulación con 5-HT sobre el largo total de neuritas por neurona a los 3 DIV.** Las neuronas a los 2 DIV se incubaron durante 24 h con 5-HT 100 nM. Los antagonistas WAY y SB se agregaron 30 min previo al agonista. Las neuronas se fijaron e inmuno tiñeron contra tubulina acetilada y el citoesqueleto de F-actina se marcó con faloidina-rodamina. Para determinar el largo total de neuritas, se sumó el largo de las neuritas primarias, secundarias y terciarias de cada neurona. Las neuronas cuantificadas corresponden a dos cultivos independientes (control n=35; 5HT 100 nM n=39; 5HT + WAY n=42 y 5HT 100 nM + SB269970 1µM n=51). Los valores del largo de neuritas son entregados por el programa NeuronJ. Los datos representan el promedio  $\pm$  EEM. Los datos se analizaron mediante el test de ANOVA para cada condición y seguido del post-test de Bonferroni. \*p< 0,05.



**Figura 28. Efecto de la estimulación con 5-HT sobre el largo promedio de neuritas por neurona a los 3 DIV.** Las neuronas a los 2 DIV se incubaron durante 24 h con 5HT 100 nM. Los antagonistas WAY y SB se agregaron 30 min previo al agonista. Las neuronas se fijaron e inmunotiñeron contra tubulina acetilada y el citoesqueleto de F-actina se marcó con faloidina-rodamina. Para determinar el largo promedio de neuritas, se sumó el largo de las neuritas primarias, secundarias y terciarias de cada neurona y se dividió por el número de neuritas. Las neuronas cuantificadas corresponden a dos cultivos independientes (control n=35; 5HT 100 nM n=39; 5HT + WAY n=42 y 5HT 100 nM + SB269970 1μM n=51). Los valores del largo de neuritas son entregados por el programa NeuronJ. Los datos representan el promedio ± EEM. Los datos se analizaron mediante el test de ANOVA para cada condición y seguido del post-test de Bonferroni. \*\*\* p< 0,001, \*\* p< 0,01, \*p< 0,05.

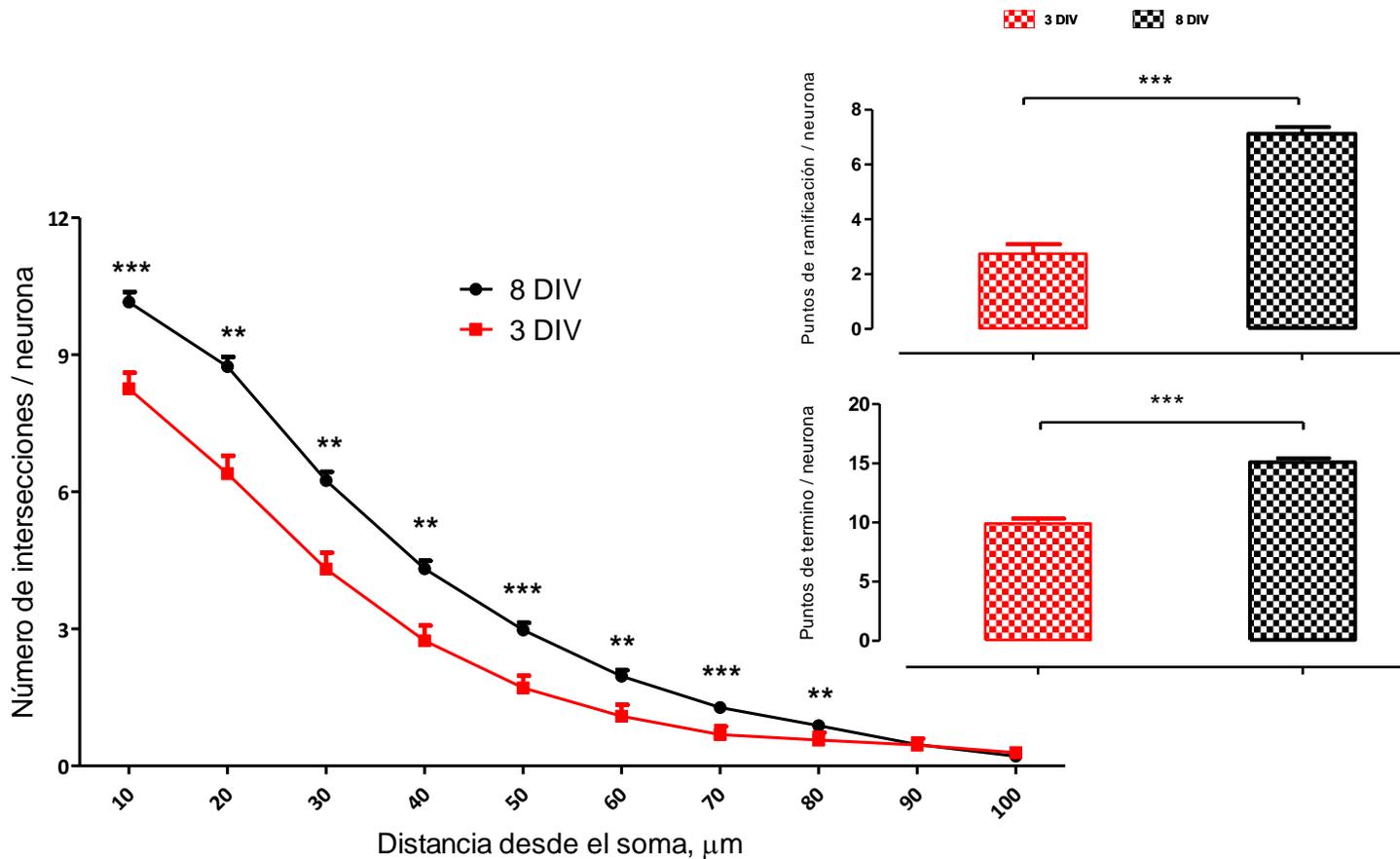
El análisis en conjunto de estos resultados indica que el 8OH-DPAT a diferencia de la serotonina, incrementa el número de neuritas primarias cortas ( $< 40 \mu\text{m}$ ), sin afectar su crecimiento. De acuerdo a los antagonistas utilizados, se descarta la participación de los receptores  $5\text{HT}_{1A}$  y  $5\text{HT}_7$  en estos efectos. Por otra parte, ambos agonistas no producen cambios sobre las dendritas primarias mayores a  $40 \mu\text{m}$ . De acuerdo a los resultados con 8OH-DPAT, podemos postular que este agonista activaría más de un receptor con acciones opuestas sobre las neuritas primarias más largas ( $> 40 \mu\text{m}$ ), donde la activación del  $5\text{HT}_7\text{-R}$  permitiría un aumento del largo.

Por otro lado, la serotonina promueve un aumento en el largo de las dendritas secundarias menores a  $20 \mu\text{m}$ ; efecto mediado por la activación de los receptores  $5\text{HT}_{1A}$  y  $5\text{HT}_7$ . Este resultado sugeriría que ambos receptores pudiesen estar localizados en dendritas cortas que serían más plásticas a los efectos tróficos de la serotonina. Es probable que la serotonina a la concentración usada se una a los distintos tipos de receptores serotoninérgicos presentes en el cultivo; no pudiéndose precisar en estas condiciones la contribución de un receptor en particular sobre la morfología. Queda la inquietud de si los receptores serotoninérgicos a los 2-3 DIV, son capaces de regular vías transduccionales asociadas a cambios morfológicos, cascadas que pudiesen estar más establecidas a mayor madurez del cultivo. De acuerdo a esto se determinó el efecto de los agonistas y antagonistas sobre las cascadas transduccionales de interés y cambios morfológicos a los 8 DIV, con la finalidad de poder precisar cuales serían los sustratos morfológicos sobre los cuales podrían actuar la subpoblación de receptores serotoninérgicos.

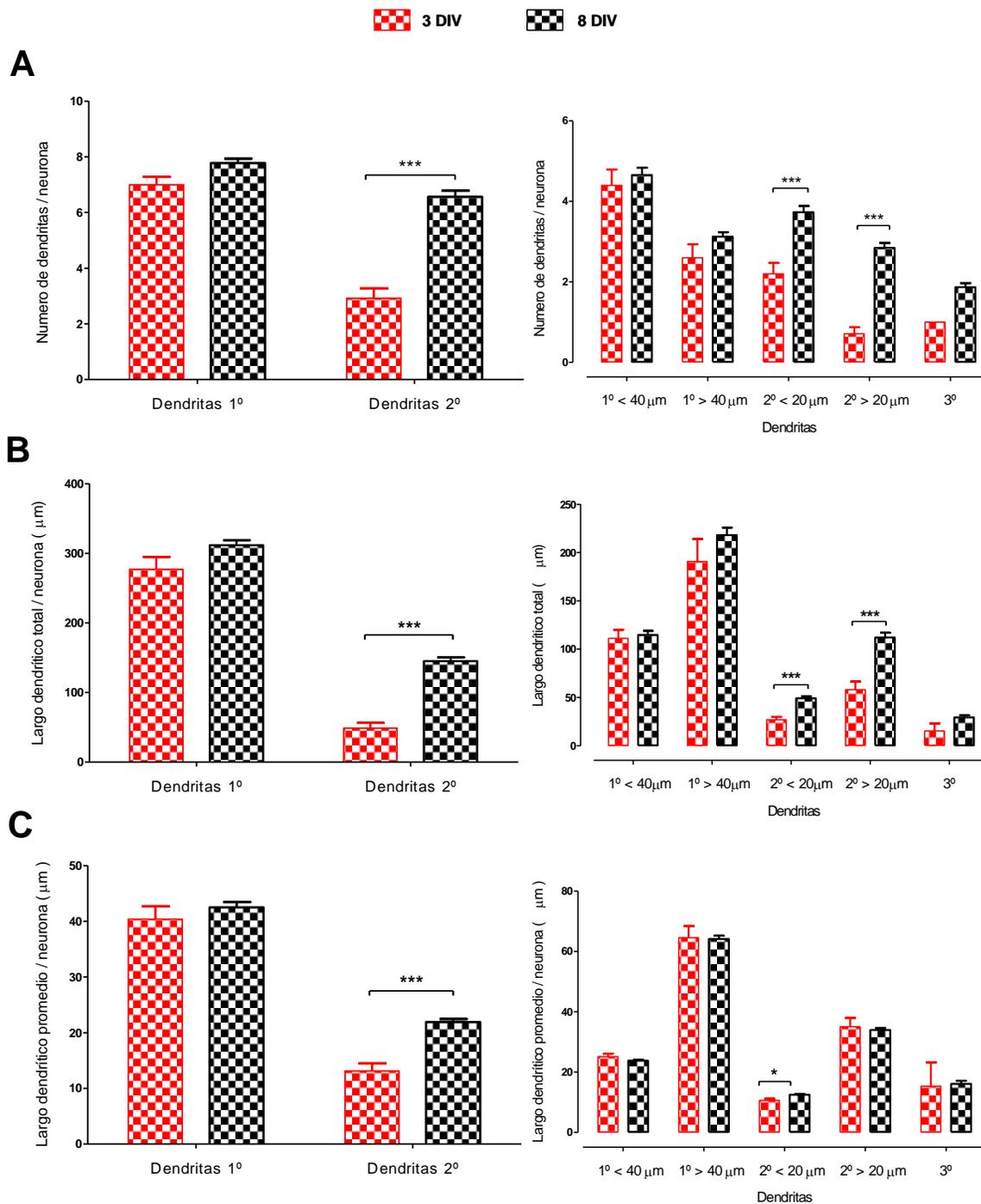
## 5.5 Comparación de la morfología dendrítica entre cultivos de 3-8 DIV

Con la finalidad de caracterizar la evolución morfológica de las neuronas hipocampales al igual que a los 3 DIV, se procedió a fijar neuronas e identificar las dendritas mediante inmunotinción para MAP2A y realizar un análisis de Sholl a 8 días de cultivo *in vitro*. Esto permitió realizar una comparación de la morfología entre cultivos con distintos estadios neuronales. Como se observa en la Figura 29, existe un máximo de intersecciones en las primeras 10  $\mu\text{m}$  tanto a los 3 y 8 DIV. Al incrementar la distancia desde el soma, se observa a los 8 DIV un desplazamiento de la curva hacia la derecha, lo que indica un aumento significativo de la complejidad dendrítica (Figura 29) debido al aumento significativo de los puntos de ramificación y puntos de término en las neuronas producto de los días de cultivo (Figura 29 inserto).

Para realizar un análisis más acabado de los cambios observados producto de los días de cultivo, las dendritas fueron clasificadas como primarias, secundarias y terciarias; donde las primeras a su vez se segregaron de acuerdo a su longitud (primarias  $<40 \mu\text{m}>$  y secundarias  $<20 \mu\text{m}>$ ). Como se observa en la Figura 30 A, el número de dendritas secundarias aumentan al doble independientemente de su largo ( $<20 \mu\text{m}>$ ). Adicionalmente, el aumento significativo del largo dendrítico total ( $2^\circ <20 \mu\text{m}>$ ) y el largo dendrítico promedio de dendritas secundarias ( $2^\circ <20 \mu\text{m}>$ ), contribuyen al aumento en la complejidad dendrítica (Figura 30 B-C). Estos resultados en su conjunto, indican que las dendritas secundarias son más plásticas que las primarias a cambios morfológicos asociados a variaciones en el número y largo.



**Figura 29. Comparación entre cultivos primarios hipocampales de 3 y 8 DIV mediante el análisis de Sholl.** Las neuronas se fijaron e inmuno tiñeron para realizar el recuento del número de intersecciones en neuronas a los 3 (n=35) y 8 (n=280) DIV mediante el análisis de Sholl. Las neuronas se fotografiaron en un microscopio confocal DSU y las dendritas se trazaron en el programa NeuronJ. Mediante el programa NeuronStudio se estableció la presencia de puntos de ramificación y los puntos de término. Utilizando el programa Bonfire (en MATLAB 7.0) se analizó la información proveniente del programa NeuronStudio y se realizó el análisis de Sholl. Los valores representan el promedio  $\pm$  E.E.M. El número de intersecciones se obtuvo mediante el programa Bonfire. La comparación de puntos de ramificación y de término entre los cultivos a los 3 y 8 DIV se muestra en los insertos A y B respectivamente. La significancia del cambio en el número de intersecciones, punto de ramificación y de término se analizó mediante análisis de t-test. \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001.



**Figura 30. Comparación del número y largo de dendritas entre cultivos primarios hipocámpales a los 3 y 8 DIV.** Las graficas muestran la variación de ciertos parámetros obtenidos de dendritas primarias y secundarias (izquierda) y a su vez segregadas en primarias menores y mayores de 40 μm, secundarias menores y mayores de 20 μm y terciarias. En (A) se muestra el número de dendritas, en (B) la variación del largo dendrítico total y en (C) el cambio del largo dendrítico promedio a los 3 (n=35) y 8 DIV (n=280). La significancia de los cambios en el número y en el largo de las dendritas se realizó mediante análisis de t-test. \*p< 0,05, \*\*\*p< 0,001.

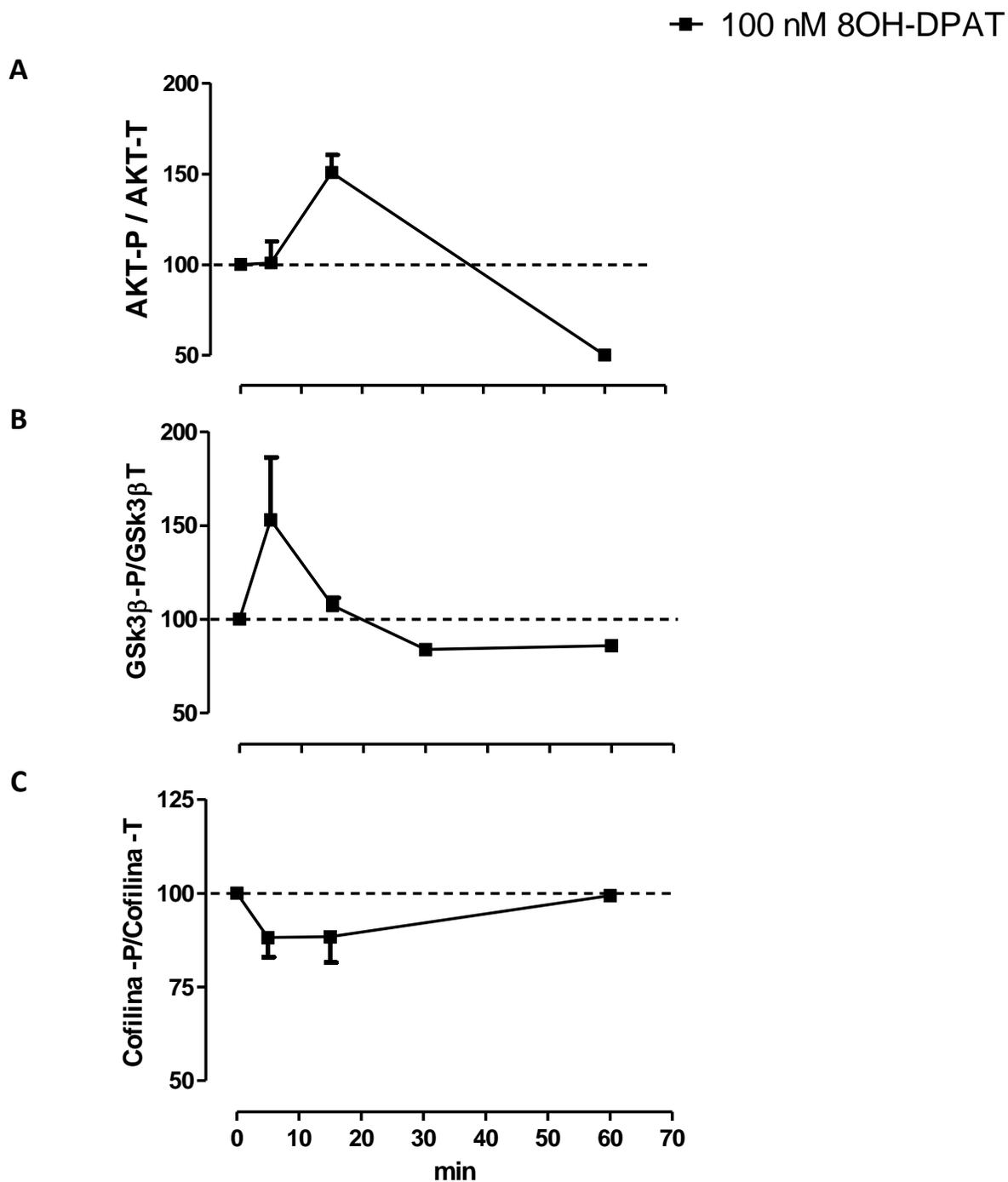
## 5.6 Determinación de los efectos de agonistas serotoninérgicos sobre vías transduccionales y su relación con la morfología neuronal a los 7 DIV

En esta sección, se determinó el efecto de agonistas serotoninérgicos al igual que a los 2 DIV, sobre la vía Akt-GSK-3 $\beta$  y cofilina. Hay que considerar que aunque el sembrado de células se realizó a la misma densidad que en los estudios precedentes, el contacto producto del crecimiento de ramificaciones puede constituirse como un factor importante en la activación basal de las vías de interés.

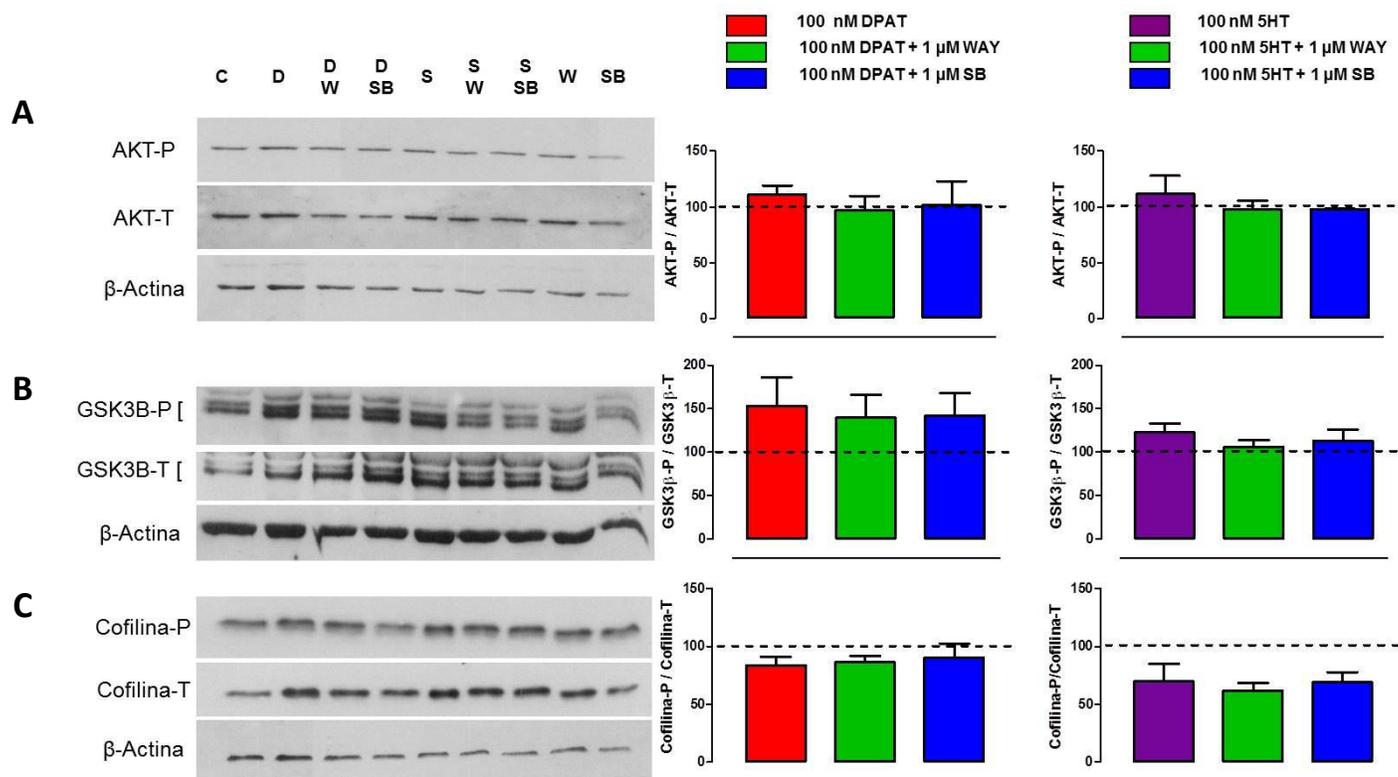
### 5.6.1 *Efecto de la concentración y temporalidad de la estimulación con agonistas serotoninérgicos y su prevención por antagonistas*

En la Figura 31, se muestra la cinética de la estimulación con 8OH-DPAT 100 nM. En la Figura 33 A, se aprecia que la adición del agonista, promueve un aumento significativo en la fosforilación de la Akt a los 15 min de estimulación vs el basal; efecto que no es prevenido por los antagonistas WAY-100635 y SB 269970 (Figura 33 A). A diferencia de la Akt, se observó un incremento a los 5 min en los niveles fosforilados de la GSK-3 $\beta$  en Ser<sup>9</sup>, aunque la magnitud fue altamente variable, probablemente debido a variaciones en el estado de fosforilación basal de la GSK-3 $\beta$  (Figura 32 B), producto quizás de un distinto grado de contacto de las neuronas en el cultivo. De forma similar, se observó una disminución a los 5 minutos, aunque no significativa, de los niveles fosforilados de la cofilina en Ser<sup>3</sup> (Figura 32 C). En ningún caso se observó efecto de los antagonistas en ambas vías, mostrando una diferencia sustancial entre los 2 y 7 DIV (Figuras 32 y 33). Estos resultados sugieren que la acción del 8OH-DPAT sobre estas cascadas transduccionales disminuiría en función de la madurez del cultivo.

A diferencia de lo observado con 8OH-DPAT, la serotonina a 100 nM no promueve cambios en los estados de fosforilación de las quinasas evaluadas en las temporalidades analizadas, sin embargo, el estímulo por 15 min fue capaz de promover una disminución significativa en la fosforilación en Ser<sup>3</sup> de la cofilina (Figura 33C); y de acuerdo a los antagonistas este efecto no estaría relacionado a los receptores 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>7</sub>.



**Figura 31. Temporalidad del cambio en el estado de la fosforilación de Akt, GSK-3 $\beta$  y cofilina promovida por el agonista 8OH-DPAT.** Los cultivos a los 7 DIV se estimularon con 100 nM de 8OH-DPAT durante 0-60 min. Los valores están expresados en porcentajes con respecto al control. A) Efecto del 8OH-DPAT sobre los niveles de la Akt. B) efectos del 8OH-DPAT sobre los niveles de GSK-3 $\beta$ . C) Efecto del 8OH-DPAT sobre los niveles de cofilina.



**Figura 32. Efecto de los antagonistas WAY y SB269970 sobre los cambios en el estado de fosforilación de AKT, GSK3β y cofilina promovida por los agonistas 8OH-DPAT y 5-HT a los 7 DIV.** Las células se estimularon durante 5 min con 100 nM de 8OH-DPAT y 5-HT en ausencia y presencia de 1 μM de los antagonistas WAY y SB269970. Los valores se normalizaron respecto al control (sin estímulo) y representan el promedio ± E.E.M. de 3 cultivos independientes. Los datos se analizaron mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y post-test de Dunns. Para determinar el efecto sobre el control se realizó el análisis de t test de datos pareados.

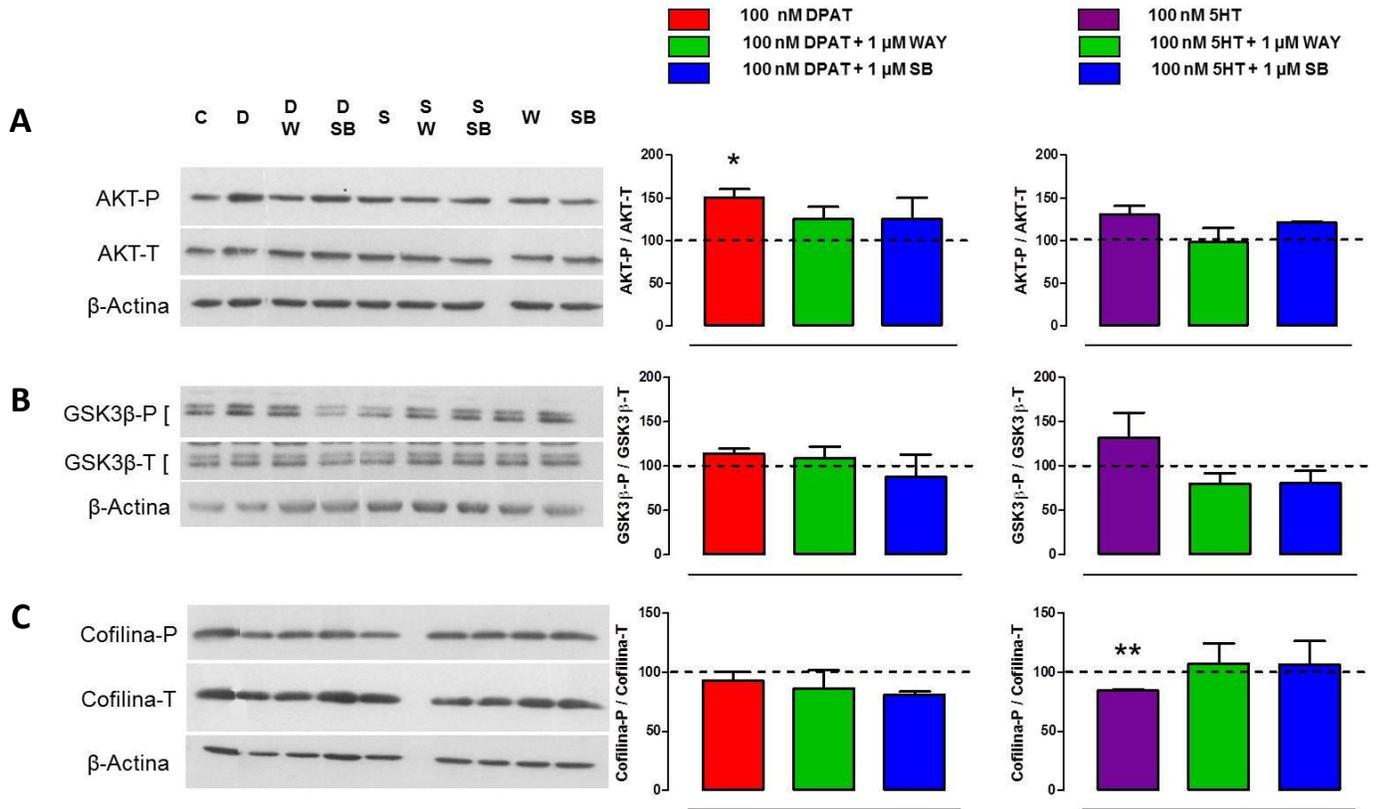
(A) Variación de los niveles de AKT-p en respuesta a los agonistas y antagonistas. ( $p > 0,05$ ).

(B) Variación de los niveles de GSK-3β-p en respuesta a los agonistas y antagonistas. ( $p > 0,05$ )

(C) Variación de los niveles de la cofilina-p en respuesta a los agonistas y antagonistas.

8OH-DPAT ( $p > 0,05$ ). 5HT ( $p = 0,0827$ ).

C= control, D=8OH-DPAT, D+W= 8OH-DPAT+WAY-100635, D+SB= 8OH-DPAT+SB269970, W=WAY-100635, SB= SB269970.



**Figura 33. Efecto de los antagonistas WAY y SB269970 sobre los cambios en el estado de fosforilación de AKT, GSK-3β y cofilina promovida por los agonistas 8OH-DPAT y 5-HT a los 7 DIV.** Las células se estimularon durante 15 min con 8OH-DPAT 100 nM y 5-HT en ausencia y presencia de 1 μM de los antagonistas WAY y SB269970. Los valores se normalizaron respecto al control (sin estímulo) y representan el promedio ± E.E.M. de 3 cultivos independientes. Los datos se analizaron mediante el test de no paramétrico de Kruskal-Wallis y post-test de Dunns. Para determinar el efecto sobre el control se realizó el análisis de t test de datos pareados.

(A) Variación de los niveles de AKT-p en respuesta a los agonistas y antagonistas.

8OH-DPAT ( $p > 0,05$ ). 5HT ( $p = 0,0737$ ).

(B) Variación de los niveles de GSK-3β-p en respuesta a los agonistas y antagonistas. ( $p > 0,05$ ).

(C) Variación de los niveles de la cofilina-p en respuesta a los agonistas y antagonistas. ( $p > 0,05$ ).

t-test \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

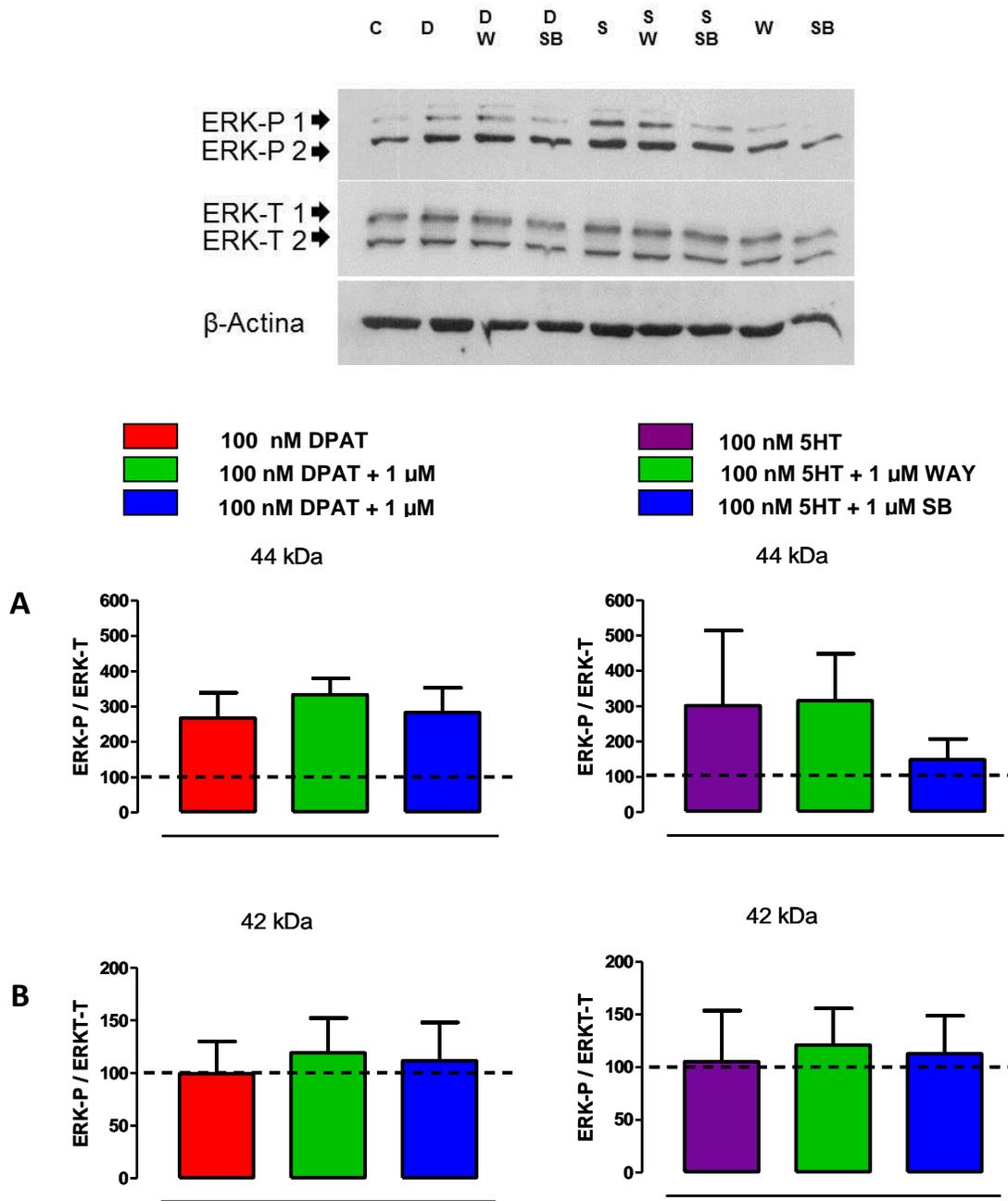
C= control, D=8OH-DPAT, D+W= 8OH-DPAT+WAY-100635, D+SB= 8OH-DPAT+SB269970, W=WAY-100635, SB= SB269970.

Existen antecedentes que demuestran la participación de los receptores  $5HT_{1A}$  y  $5HT_7$  sobre la activación de las ERK1/2 en neuronas hipocampales utilizando 8OH-DPAT y 5-CT (agonista de ambos receptores) (Errico y cols., 2001). En las Figuras 34 y 35 se observa una alta variabilidad en el grado de fosforilación de la ERK1 en presencia de los agonistas usados. No obstante, en presencia del WAY-100635 o SB269970 no se modifica esta fosforilación, sugiriendo la participación de otro receptor en este efecto. A mayor tiempo de estimulación se observaron cambios no significativos en comparación al estímulo de 5 min en el estado de fosforilación de la ERK (Figura 34 y 35). La serotonina no evocó cambios significativos sobre la ERK1/2 a los 5 y 15 min de estimulación (Figuras 34 y 35).

Con la finalidad de poder hacer una correlación entre los efectos de la serotonina sobre cascadas transduccionales y la morfología neuronal es que se realizaron experimentos a baja densidad neuronal, que desde el punto de vista metodológico fue dificultoso. Luego de la estimulación por 10 min se observa un incremento variable de los niveles de la Akt-p fosforilada, destacándose que no existe variación en el estado de fosforilación de la GSK-3 $\beta$ ; resultado semejante a lo observado en cultivos mantenidos a una alta densidad celular. En contraste, por la presencia de la serotonina se observó una tendencia al incremento en los niveles de la cofilina-p. Más aún, la serotonina induce una tendencia al alza en los niveles de la ERK fosforilada y que en concordancia, ésta disminuye no significativamente por el tratamiento con WAY-100635 (Figuras 36 y 37).

### 5.7 Efectos de los agonistas serotoninérgicos sobre la morfología dendrítica a los 8 DIV

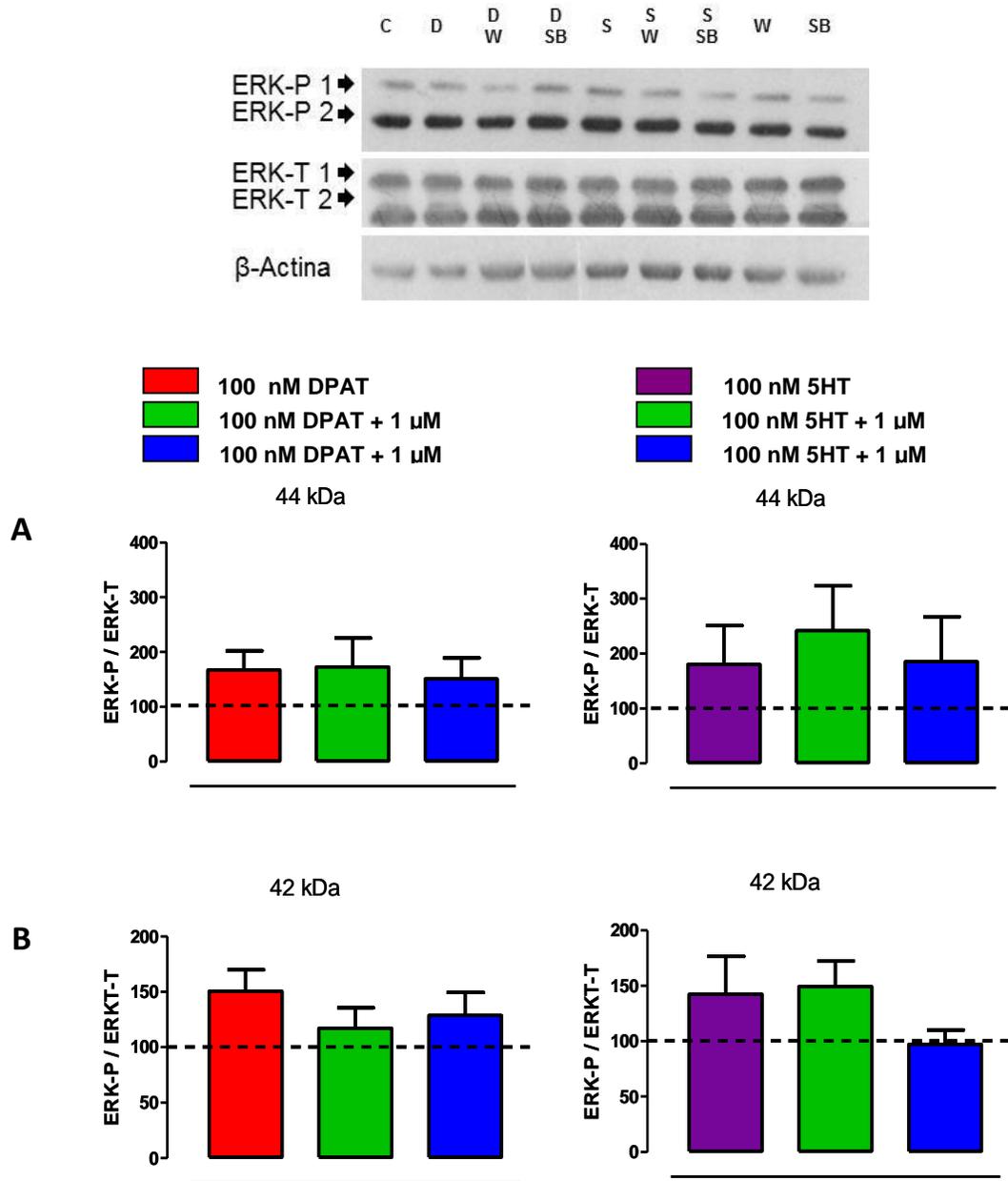
Con el objetivo de precisar el aporte de los agonistas serotoninérgicos sobre la morfología neuronal y cuales de los receptores están involucrados en los cambios, se analizaron neuronas a los 7 DIV que presentan una mayor madurez, ya que a este día del cultivo se asegura que las neuronas se encuentren en un estadio avanzado de su desarrollo



**Figura 34. Efecto de los antagonistas WAY y SB269970 sobre los cambios en el estado de fosforilación de ERK promovida por los agonistas 8OH-DPAT y 5-HT a los 7 DIV.** Las células se estimularon durante 5 min con 100 nM de 8OH-DPAT y 5-HT en ausencia y presencia de 1  $\mu$ M de los antagonistas WAY y SB269970. Los valores se normalizaron respecto al control (sin estímulo) y representan el promedio  $\pm$  E.E.M. de 3 cultivos independientes. Los datos se analizaron mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y post-test de Dunns.

(A) Variación de los niveles de ERK-p (44 kDa) en respuesta a los agonistas y antagonistas. 8OH-DPAT ( $p > 0,05$ ). 5-HT ( $p > 0,05$ ).

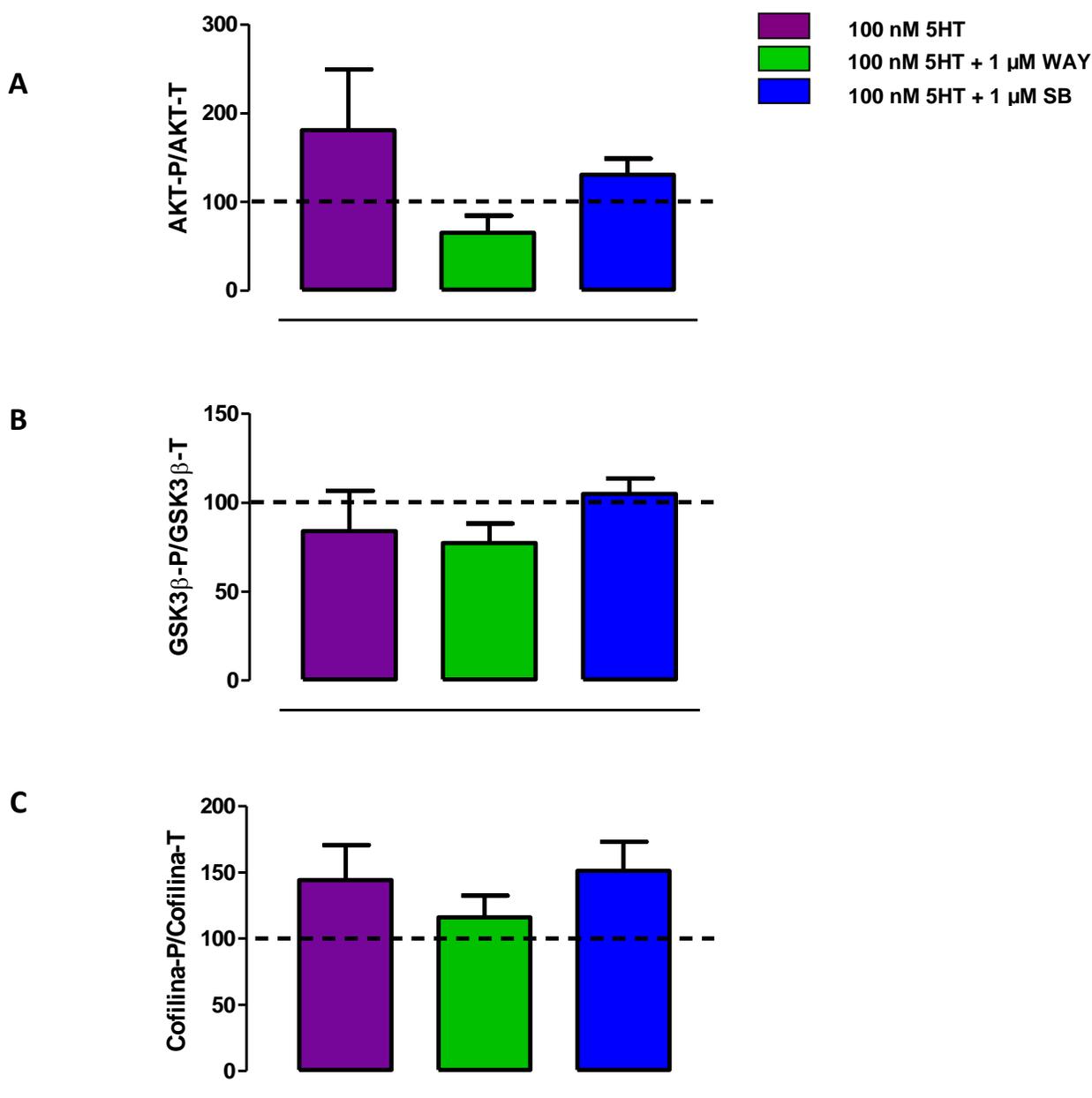
(B) Variación de los niveles de ERK-p (42 kDa) en respuesta a los agonistas y antagonistas. 8OH-DPAT ( $p > 0,05$ ). 5-HT ( $p > 0,05$ ).



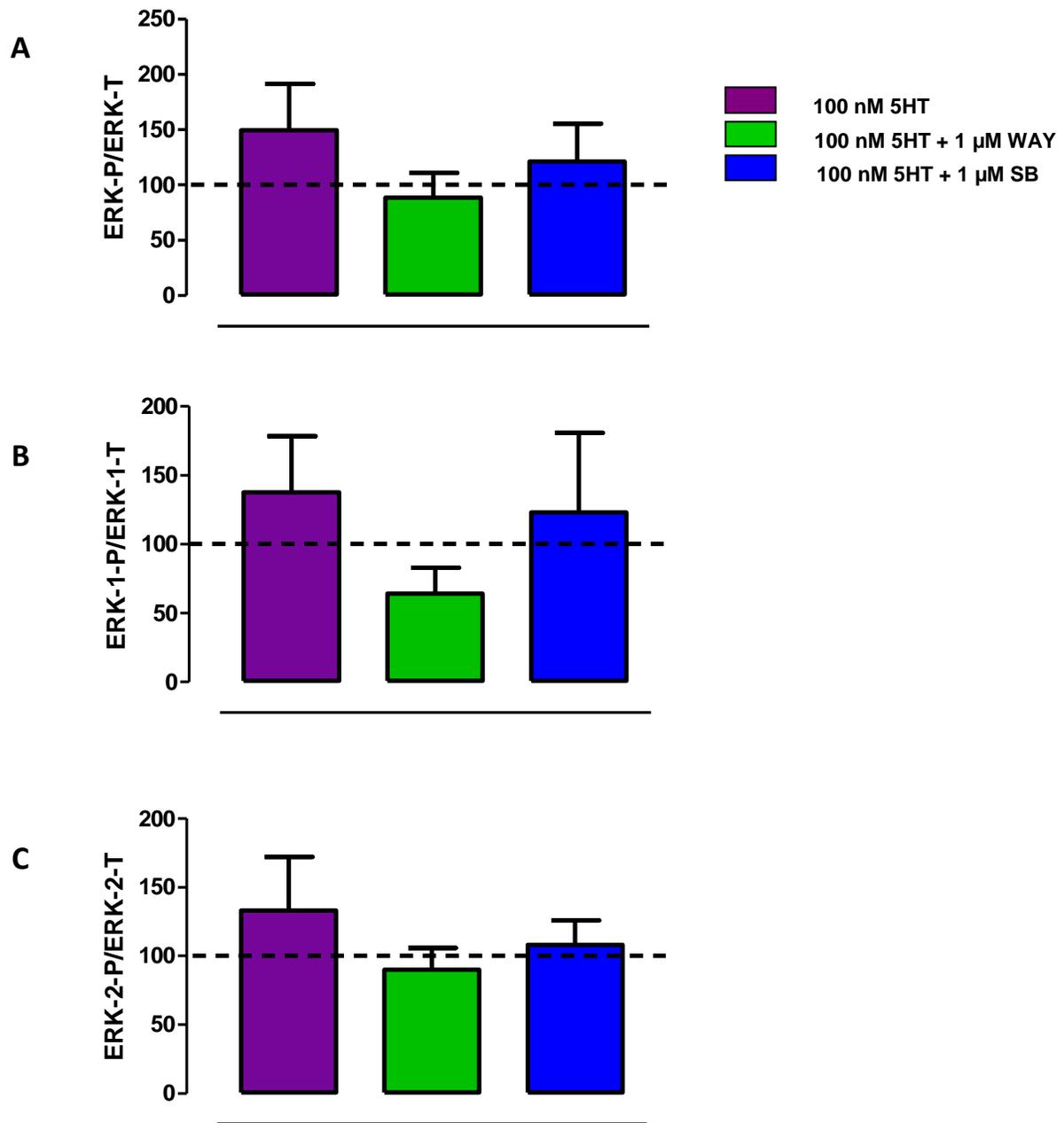
**Figura 35. Efecto de los antagonistas WAY y SB269970 sobre los cambios en el estado de fosforilación de ERK promovida por los agonistas 8OH-DPAT y 5-HT a los 7 DIV.** Las células se estimularon durante 15 min con 8OH-DPAT 100 nM y 5-HT en ausencia y presencia de 1 μM de los antagonistas WAY y SB269970. Los valores se normalizaron respecto al control (sin estímulo) y representan el promedio ± E.E.M. de 3 cultivos independientes. Los datos se analizaron mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y post-test de Dunns.

(A) Variación de los niveles de ERK-p (44 kDa) en respuesta a los agonistas y antagonistas. 8OH-DPAT ( $p > 0,05$ ). 5-HT ( $p > 0,05$ ).

(B) Variación de los niveles de ERK-p (42 kDa) en respuesta a los agonistas y antagonistas. 8OH-DPAT ( $p > 0,05$ ). 5-HT ( $p > 0,05$ ).



**Figura 36.** Efecto de los antagonistas WAY y SB269970 sobre los cambios en el estado de fosforilación de Akt, GSK-3 $\beta$  y cofilina promovida por 5-HT a los 7 DIV, en células sembradas a baja densidad. Las células se estimularon durante 10 min con 5-HT 100 nM en ausencia y presencia de 1  $\mu$ M de los antagonistas WAY y SB269970. Los valores se normalizaron respecto al control (sin estímulo) y representan el promedio  $\pm$  E.E.M. de 2-3 cultivos independientes. Los datos se analizaron mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y post-test de Dunns. (A) Variación de los niveles de Akt-p en respuesta a los agonistas y antagonistas (n=2) (B) Variación de los niveles de GSK-3 $\beta$ -p en respuesta a los agonistas y antagonistas. (p>0,05). (C) Variación de los niveles de la cofilina-p en respuesta a los agonistas y antagonistas. (p>0,05).



**Figura 37. Efecto de los antagonistas WAY y SB269970 sobre los cambios en el estado de fosforilación de ERK promovida por 5-HT a los 7 DIV, en células sembradas a baja densidad.** Las células se estimularon durante 10 min con 5-HT 100 nM en ausencia y presencia de 1 μM de los antagonistas WAY y SB269970. Los valores se normalizaron respecto al control (sin estímulo) y representan el promedio ± E.E.M. de 3 cultivos independientes. Los datos se analizaron mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y post-test de Dunns. (A) Variación de los niveles de ERK1/2-p en respuesta a los agonistas y antagonistas. ( $p > 0,05$ ). (B) Variación de los niveles de ERK1-p en respuesta a los agonistas y antagonistas. ( $p > 0,05$ ). (C) Variación de los niveles de ERK2-p en respuesta a los agonistas y antagonistas. ( $p > 0,05$ ).

morfológico, donde las dendritas y axón están establecidos, pero aún son potencialmente plásticas. Al igual que a los 2 DIV, las neuronas con 7 DIV se estimularon por 24 horas y fueron fijadas a los 8 DIV. Posteriormente fueron analizadas tanto en su complejidad dendrítica como en el número y largo dendrítico.

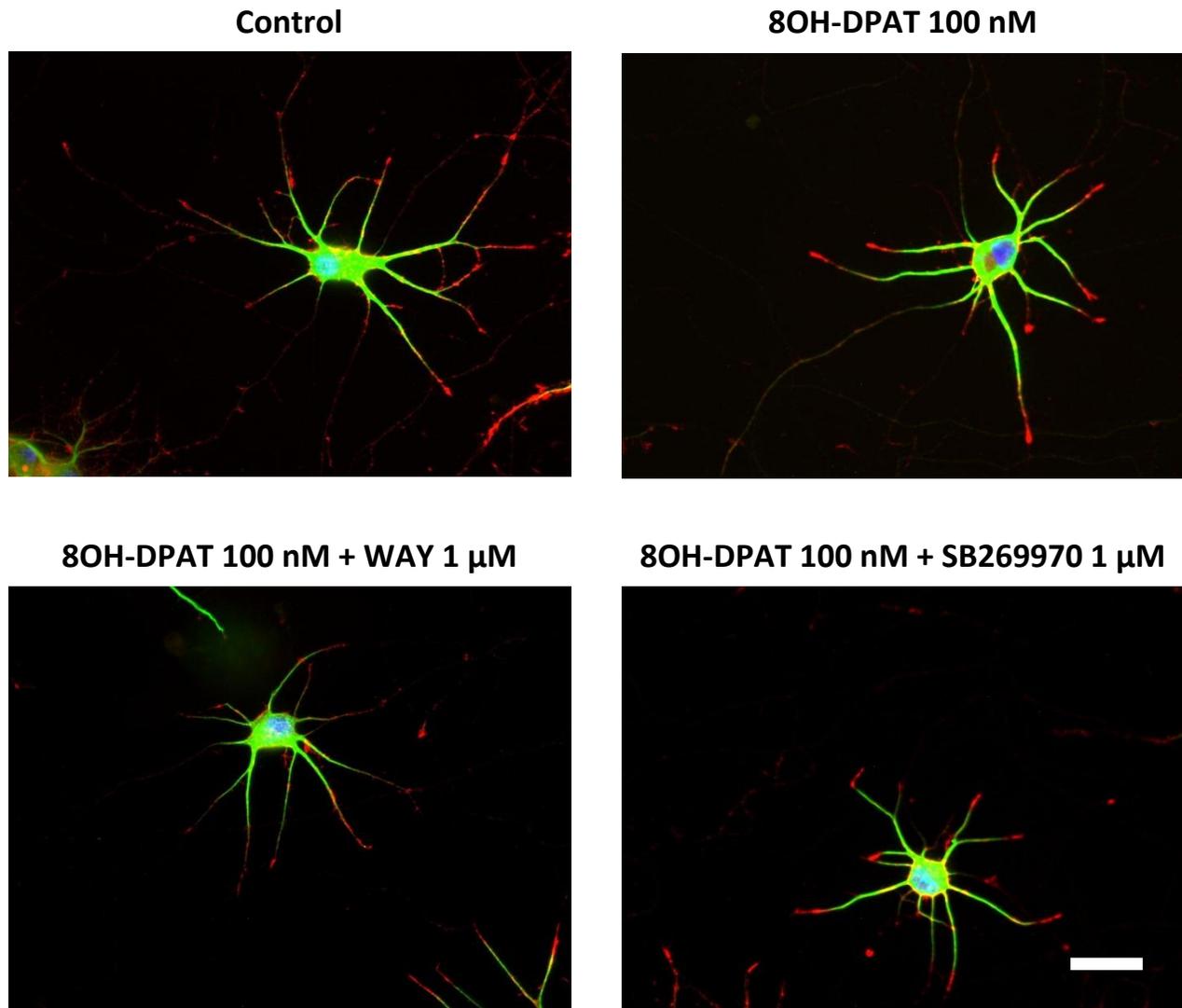
#### 5.7.1 *Efecto del 8OH-DPAT y los antagonistas WAY-100635 y SB269970*

En la Figura 38, se muestran imágenes representativas de neuronas a los 8 DIV posterior a las 24 horas de incubación con 8OH-DPAT y en presencia y ausencia de los antagonistas WAY-100635 y SB269970. Estas neuronas fueron marcadas para MAP2A y faloidina rodamina. Se observa que el estímulo con 8OH-DPAT no provoca cambios sustanciales en la morfología; no obstante el antagonismo del 5HT<sub>7</sub>-R y la posterior adición del agonista, pareciera incrementar el número de dendritas. Para analizar las consecuencias de agonistas y antagonistas sobre la morfología se procedieron a realizar el análisis de Sholl y determinación del número y largo dendrítico.

Del análisis de Sholl se desprende que el estímulo de 24 h con 8OH-DPAT, no afecta la complejidad dendrítica. Sin embargo, la estimulación con 8OH-DPAT posterior a la adición de SB269970, pero no de WAY-100635, produce un desplazamiento hacia la izquierda en el análisis de Sholl indicando una disminución significativa en la complejidad entre los 20-30  $\mu\text{m}$  (Figura 39). Este resultado sugiere que el 8OH-DPAT activa a más de un receptor y que de acuerdo a los antagonistas utilizados uno de ellos correspondería al 5HT<sub>7</sub>-R. Se observa que la adición de ambos antagonistas por sí solos no producen cambios en la complejidad neuronal (ver inserto Figura 39).

#### 5.7.2 *Efecto del 8OH-DPAT sobre el número, largo total y largo promedio de dendritas*

El estímulo con 8OH-DPAT no produce efectos sobre el número, largo total y largo promedio de las dendritas primarias (Figuras 40-42). Sin embargo, el 8OH-DPAT



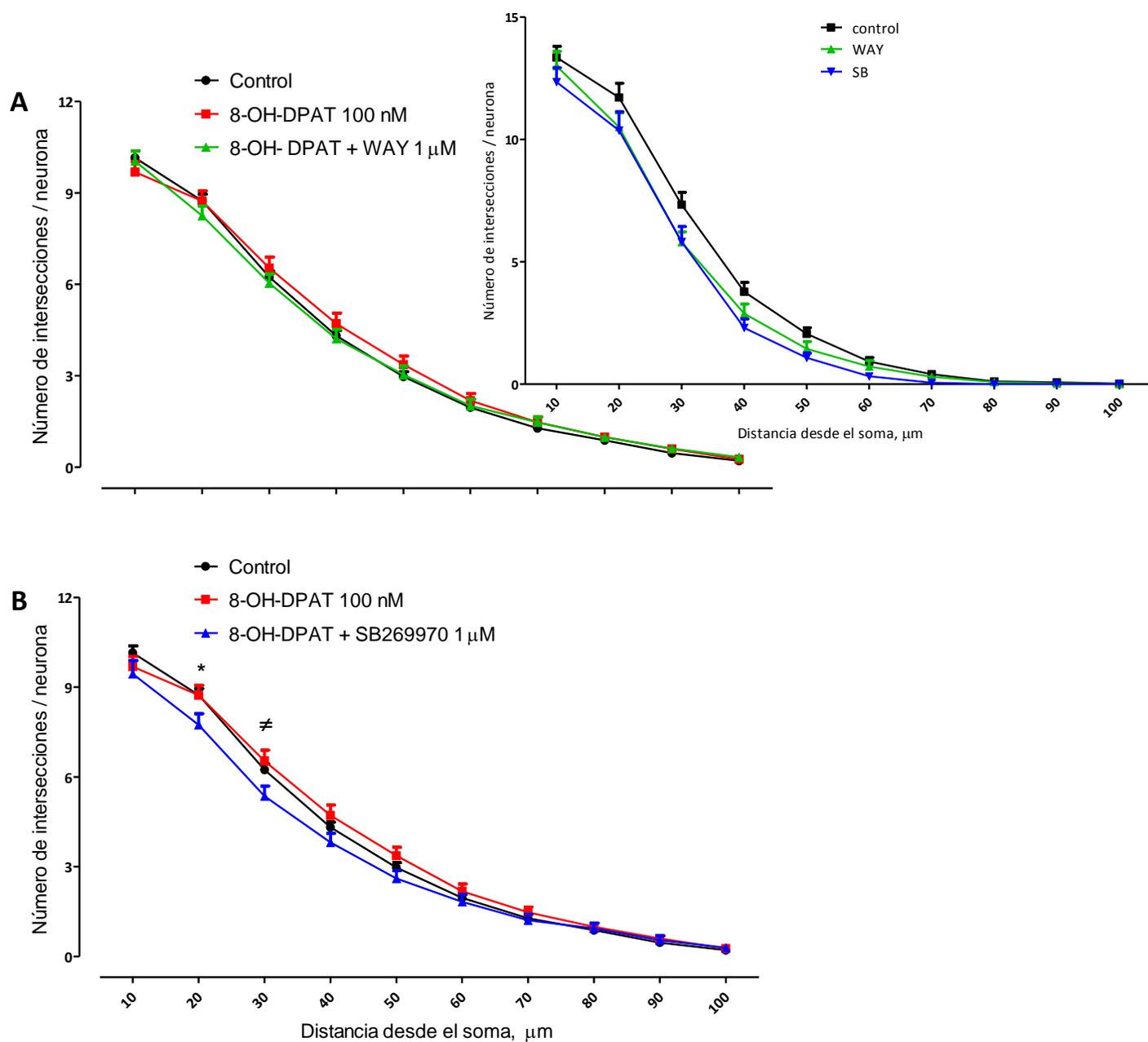
**Figura 38. Imágenes representativas de neuronas 8 DIV utilizadas para medición de la morfología dendrítica.** Las neuronas se cultivaron durante 7 días y se estimularon por 24 horas. A los 8 DIV se fijaron e inmuno tiñeron con MAP2A (marcador dendrítico, fluorescencia verde) y con faloidina-rodamina (marcador de citoesqueleto de actina, fluorescencia roja), junto con la tinción nuclear Hoechst (fluorescencia azul). Se utilizó un microscopio confocal DSU, objetivo 40X. Los canales se integraron a través del programa ImageJ. La barra representa 50  $\mu\text{m}$ . Las neuronas cuantificadas corresponden a 3 cultivos independientes (control  $n= 280$ ; 8OH-DPAT 100 nM  $n=102$ ; 8OH-DPAT + WAY  $n=125$  y 8OH-DPAT 100 nM + SB269970 1 $\mu\text{M}$   $n=101$ ).

posterior a la adición de SB269970, promueve un aumento significativo del número de dendritas primarias menores de 40  $\mu\text{m}$ , disminuye el largo dendrítico promedio de dendritas primarias mayores y menores a 40  $\mu\text{m}$ . Adicionalmente, el 8OH-DPAT promueve un aumento en el largo dendrítico promedio de dendritas secundarias  $> 20 \mu\text{m}$ , efecto que es antagonizado por WAY-100635 y SB269970 (Figura 42).

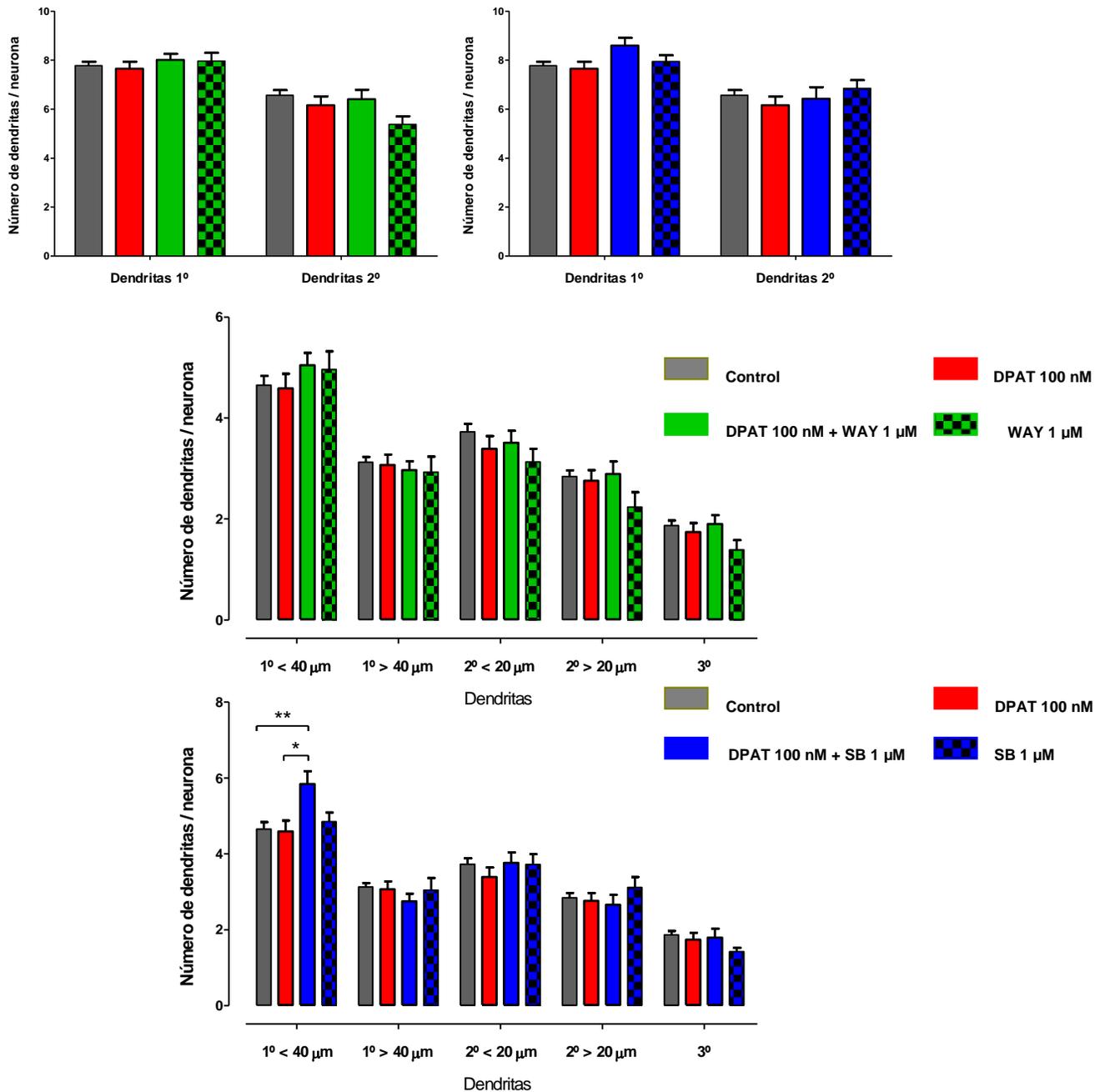
En resumen, estos resultados sugieren, que la activación del 5HT<sub>7</sub>-R aumenta la complejidad dendrítica, cambios asociados a un mayor crecimiento de las dendritas primarias. Por otra parte, los receptores 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>7</sub>, estimulan el crecimiento de las dendritas secundarias. Se observa que la adición de ambos antagonistas por si mismo no provoca cambios sobre la morfología dendrítica (Figuras 40-42).

### *5.7.3 Efecto de la serotonina y los antagonistas WAY-100635 y SB269970*

La Figura 43 se muestran imágenes representativas de neuronas a los 8 DIV posterior a las 24 h de su incubación con serotonina y los antagonistas WAY-100635 y SB269970. Las neuronas fueron marcadas para MAP2A y faloidina rodamina. Se destaca que el estímulo con 5-HT, provoca cualitativamente una disminución en el número y largo dendrítico, efecto prevenido por el WAY. El estímulo con serotonina promueve un desplazamiento hacia la izquierda en el análisis de Sholl. Esta modificación se debe a una disminución significativa del número de intersecciones entre los 40-50 y 80-90  $\mu\text{m}$  de distancia desde el soma; efecto prevenido por WAY-100635 y no por el SB269970, sugiriendo que la activación del 5HT<sub>1A</sub>-R disminuiría la complejidad dendrítica (Figura 44).

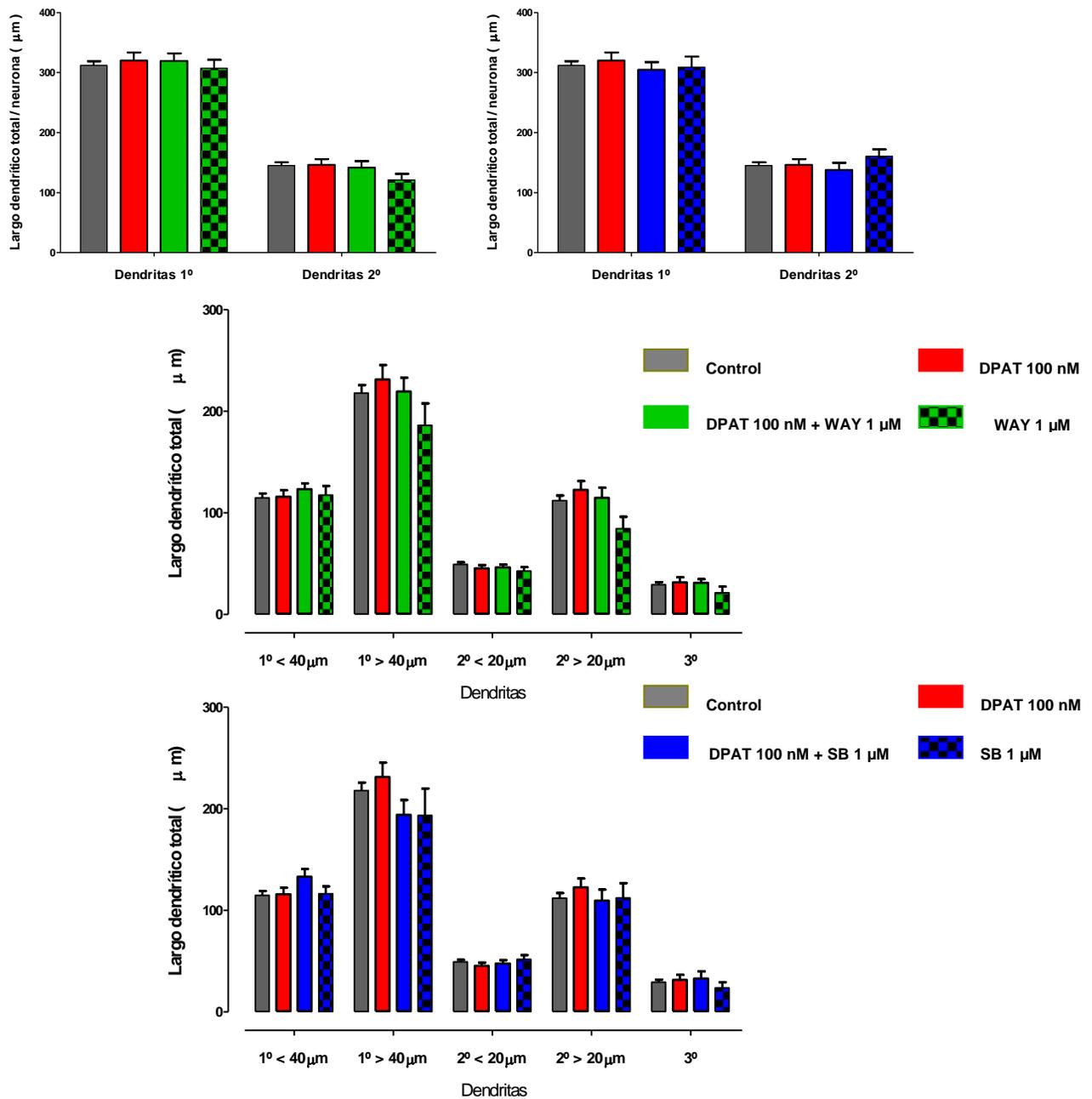


**Figura 39. Efecto del 8OH-DPAT sobre la complejidad dendrítica de cultivos primarios hipocámpales a los 8 DIV.** Los cultivos se incubaron durante 24 h con 8OH-DPAT 100 nM. Los antagonistas WAY (A) y SB (B) se agregaron 30 min previo al agonista. Las neuronas se fijaron e inmuno tiñeron contra MAP2A y el citoesqueleto de F-actina se marcó con faloidina-rodamina. Inserto. Efectos de los antagonistas sobre la complejidad neuronal. El número de intersecciones son entregadas por el programa Bonfire. Las neuronas cuantificadas corresponden a 3 cultivos independientes (control n= 280; 8OH-DPAT 100 nM n=102; 8OH-DPAT + WAY n=125 y 8OH-DPAT 100 nM + SB269970 1 $\mu$ M n=101). Los datos representan el promedio  $\pm$  EEM. Los datos fueron analizados mediante el test de ANOVA para cada condición y seguido del post-test de Bonferroni. Análisis de ANOVA A,  $p > 0.05$ ; B,  $p < 0.05$ . Post-test: \* = Control v/s 8-OH-DPAT+ SB269970,  $\neq$  = 8-OH-DPAT v/s 8-OH-DPAT + SB269970. \* $p < 0,05$ ,  $\neq p < 0,05$ .

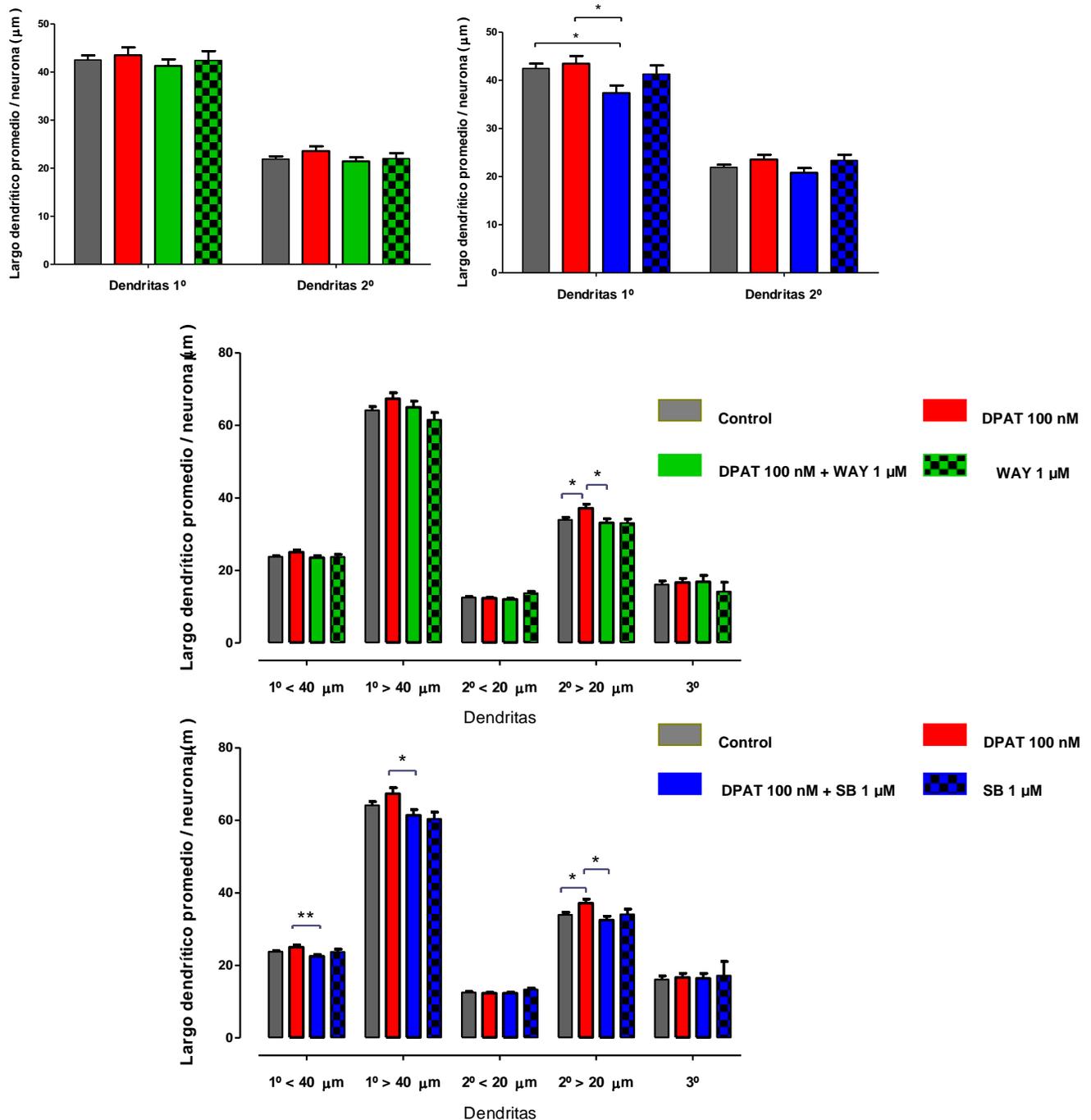


**Figura 40. Efecto de la estimulación con 8OH-DPAT sobre el número de dendritas primarias, secundarias y terciarias por neurona a los 8 DIV.** Las neuronas a los 7 DIV se incubaron durante 24 h con 8OH-DPAT 100 nM. Los antagonistas WAY y SB se agregaron 30 min previo al agonista. Las neuronas se fijaron e inmuno tiñeron contra MAP2A y el citoesqueleto de F-actina se marcó con faloidina-rodamina. Las neuronas cuantificadas corresponden a 3 cultivos independientes (control n=280; 8OH-DPAT 100 nM n=102; 8OH-DPAT + WAY n=125 y 8OH-DPAT 100 nM + SB269970 1μM n=89). Los valores del número dendrítico son entregados por el programa NeuronJ. Los datos representan el promedio ± EEM. Los datos se analizaron mediante el test de ANOVA para cada condición y seguido del post-test de Bonferroni.

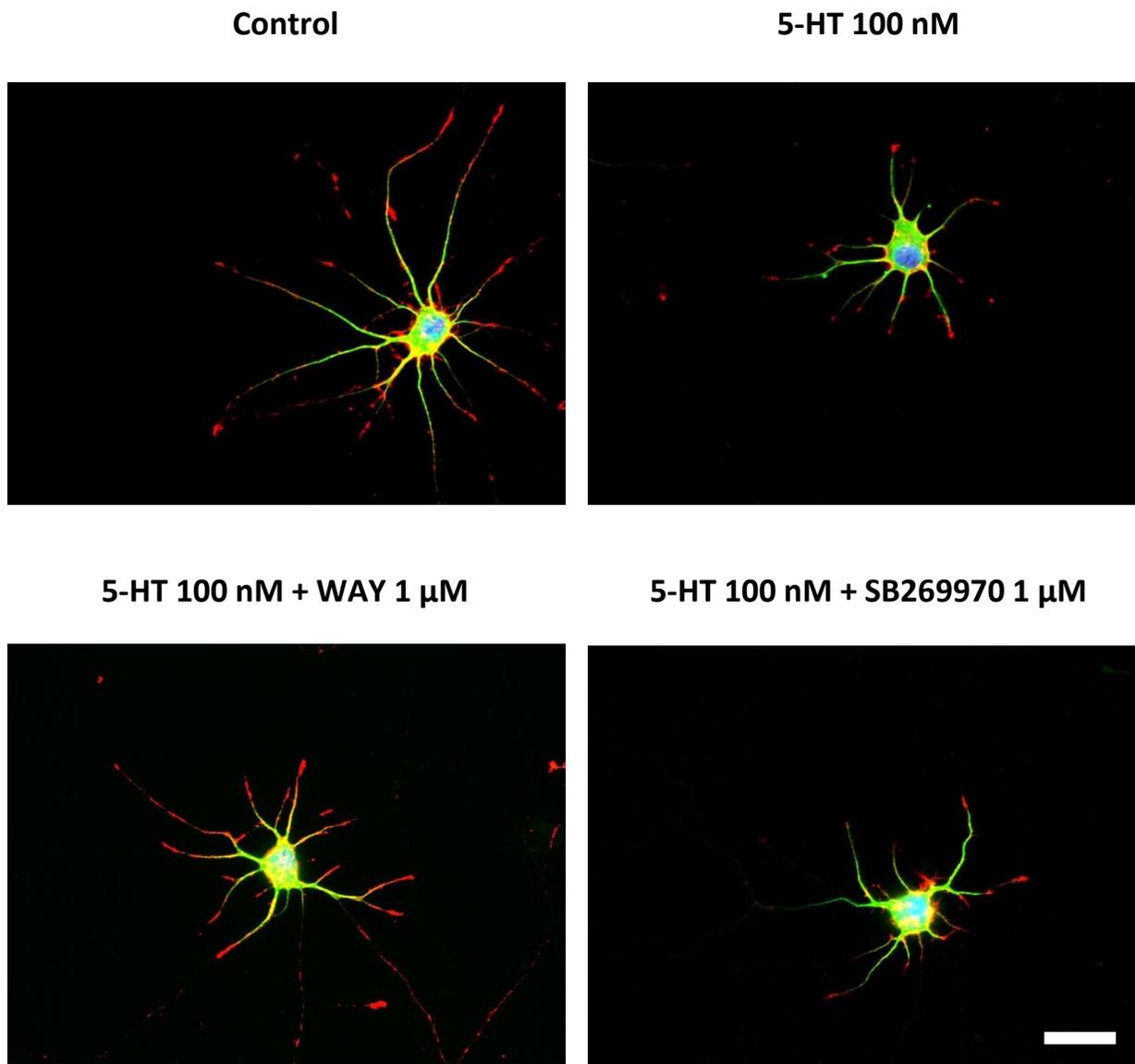
\*\* p < 0,01, \* < p 0,05.



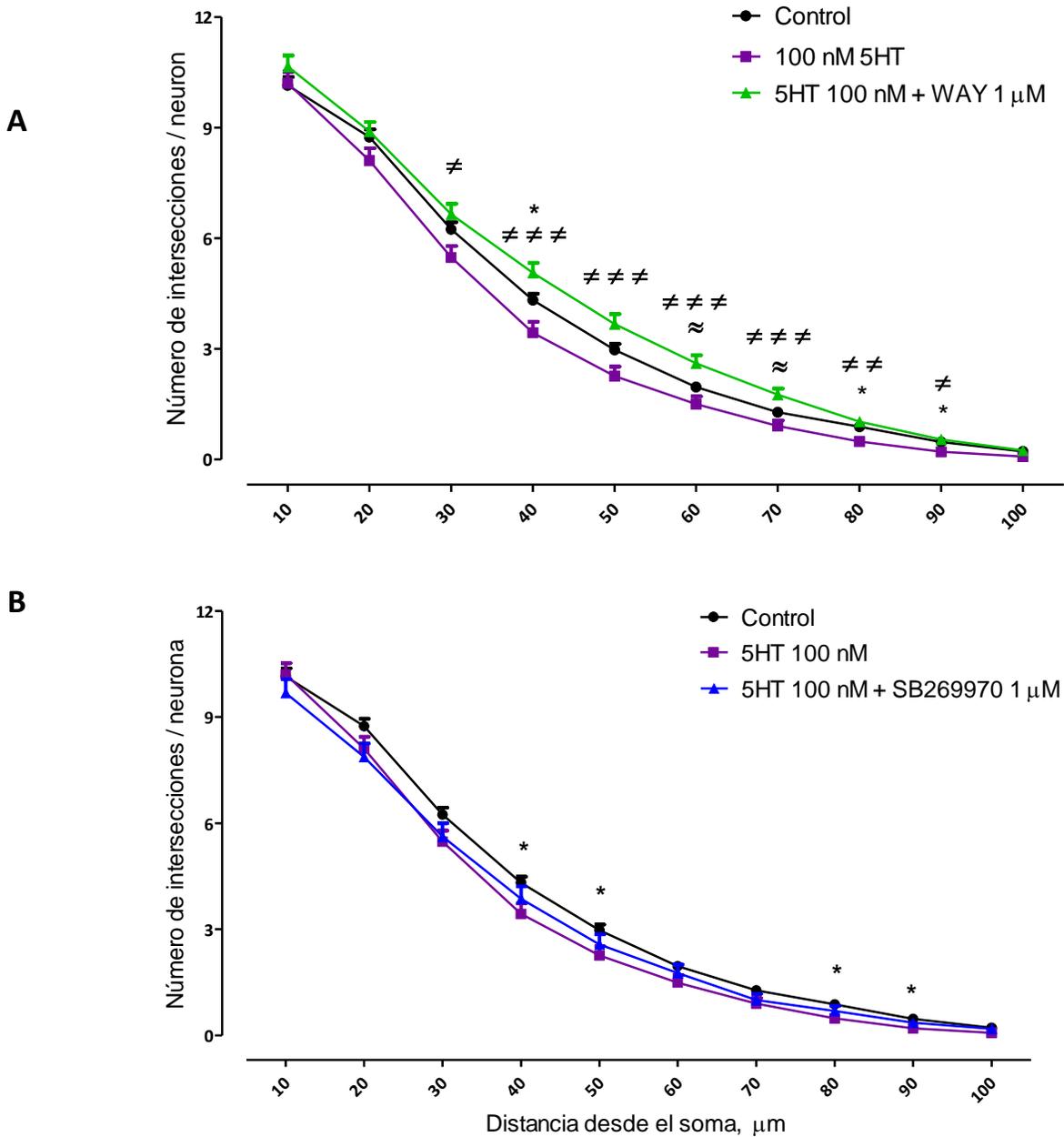
**Figura 41. Efecto de la estimulación con 8OH-DPAT sobre el largo dendrítico total por neurona a los 8 DIV.** Las neuronas a los 7 DIV se incubaron durante 24 h con 8OH-DPAT 100 nM. Los antagonistas WAY y SB se agregaron 30 min previo al agonista. Las neuronas se fijaron e inmuno tiñeron contra MAP2A y el citoesqueleto de F-actina se marcó con faloidina-rodamina. Para determinar el largo dendrítico total, se sumó el largo de las dendritas primarias, secundarias y terciarias de cada neurona. Las neuronas cuantificadas corresponden a tres cultivos independientes (control n=280; 8OH-DPAT 100 nM n=102; 8OH-DPAT + WAY n=125 y 8OH-DPAT 100 nM + SB269970 1μM n=89). Los valores del largo dendrítico son entregados por el programa NeuronJ. Los datos representan el promedio ± EEM. Los datos se analizaron mediante el test de ANOVA para cada condición y seguido del post-test de Bonferroni.



**Figura 42. Efecto de la estimulación con 8OH-DPAT sobre el largo dendrítico promedio por neurona a los 8 DIV.** Las neuronas a los 7 DIV se incubaron durante 24 h con 8OH-DPAT 100 nM. Los antagonistas WAY y SB se agregaron 30 min previo al agonista. Las neuronas se fijaron e inmuno tiñeron contra MAP2A y el citoesqueleto de F-actina se marcó con faloidina-rodamina. Para determinar el largo dendrítico promedio, se sumó el largo de las dendritas primarias, secundarias y terciarias de cada neurona y se dividió por el número de dendritas. Las neuronas cuantificadas corresponden a tres cultivos independientes (control n=280; 8OH-DPAT 100 nM n=102; 8OH-DPAT + WAY n=125 y 8OH-DPAT 100 nM + SB269970 1μM n=89). Los valores del largo dendrítico son entregados por el programa NeuronJ. Los datos representan el promedio  $\pm$  EEM. Los datos se analizaron mediante el test de ANOVA para cada condición y seguido del post-test de Bonferroni. \*\* p < 0,01, \* p < 0,05.



**Figura 43. Imágenes representativas de neuronas 8 DIV utilizadas para medición de morfología dendrítica.** Las neuronas se cultivaron durante 7 días y se estimularon por 24 horas. A los 8 DIV se fijaron e inmuno teñidas con MAP2A (marcador dendrítico, fluorescencia verde) y con faloidina-rodamina (marcador de citoesqueleto de actina, fluorescencia roja), junto con la tinción nuclear Hoechst (fluorescencia azul). Se utilizó un microscopio confocal DSU, objetivo 40X. Los canales fueron integrados a través del programa ImageJ. La barra representa 50  $\mu\text{m}$ . Las neuronas cuantificadas corresponden a 3 cultivos independientes (Control=280, 5HT 100 nM =119, 5HT 100 nM + WAY 1  $\mu\text{M}$  =152 y 5HT 100 nM + SB2699701  $\mu\text{M}$  =82).



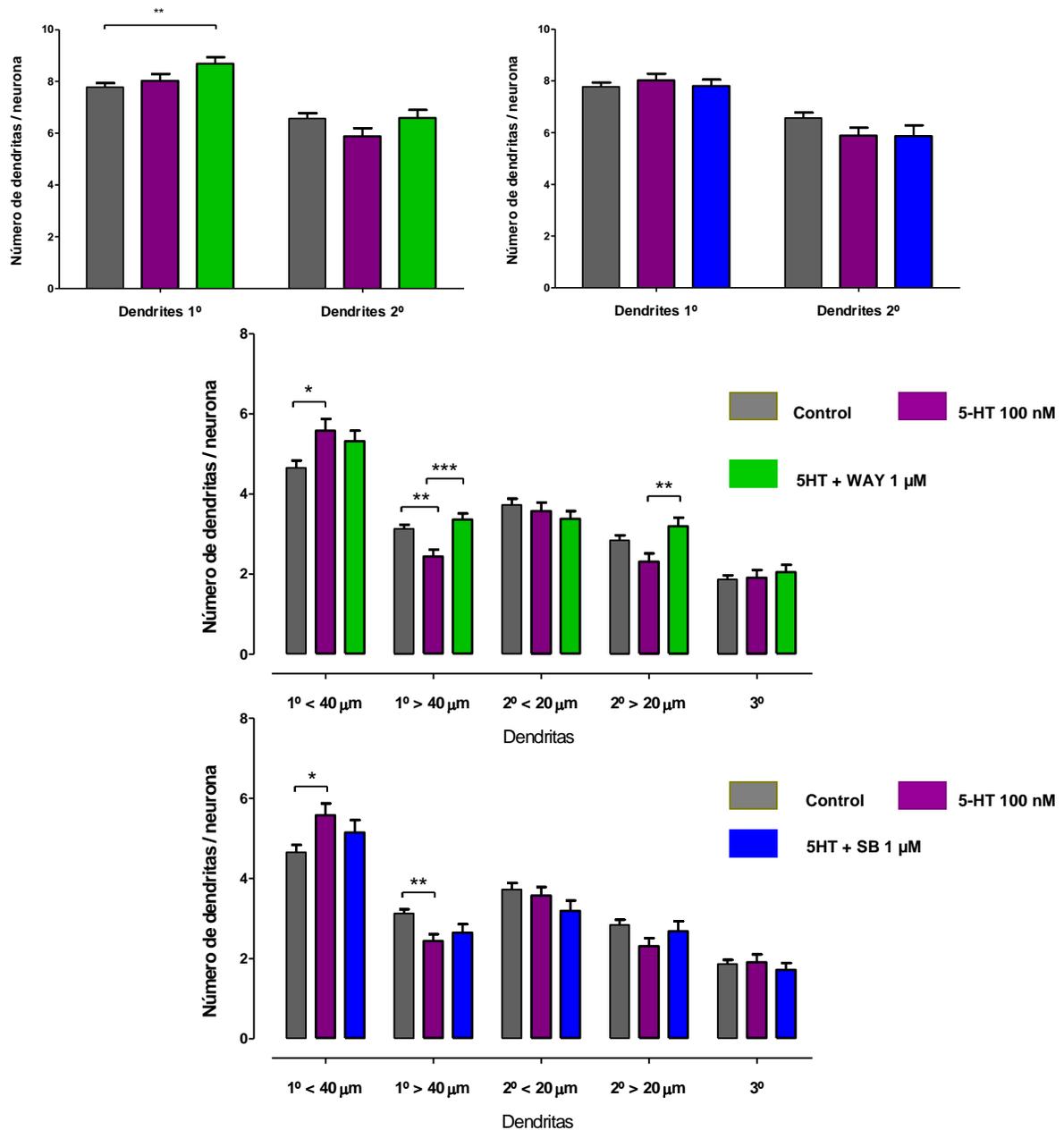
**Figura 44. Efecto de la 5-HT sobre la complejidad dendrítica de cultivos primarios de hipocampo de rata 8 DIV.** Los cultivos se incubaron durante 24 h con 5-HT 100 nM. Los antagonistas WAY (A) y SB (B) se agregaron 30 min previo al agonista. Las neuronas se fijaron e inmuno tiñeron contra MAP2A y el citoesqueleto de F-actina se marcó con faloidina-rodamina. El número de intersecciones son entregados por el programa Bonfire. Las neuronas cuantificadas corresponden a tres cultivos independientes (control n=280, 5HT 100 nM n=119, 5HT 100 nM + WAY 1 μM n=152, y 5-HT 100 nM + SB269970 1μM n=82. Los datos representan el promedio ± EEM. Los datos fueron analizados mediante el test de ANOVA para cada condición y seguido del post-test de Bonferroni. Análisis de ANOVA, A,  $p < 0,001$ ; B,  $p < 0,05$ . Post-test: \* = Control v/s 5-HT, ≈ = control v/s 5-HT + WAY, # = 5-HT vs 5-HT + WAY. \* $p < 0,05$ , # $p < 0,05$ , ≈ $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$ .

#### 5.7.4 Efecto de la serotonina sobre el número, largo dendrítico total y largo dendrítico promedio

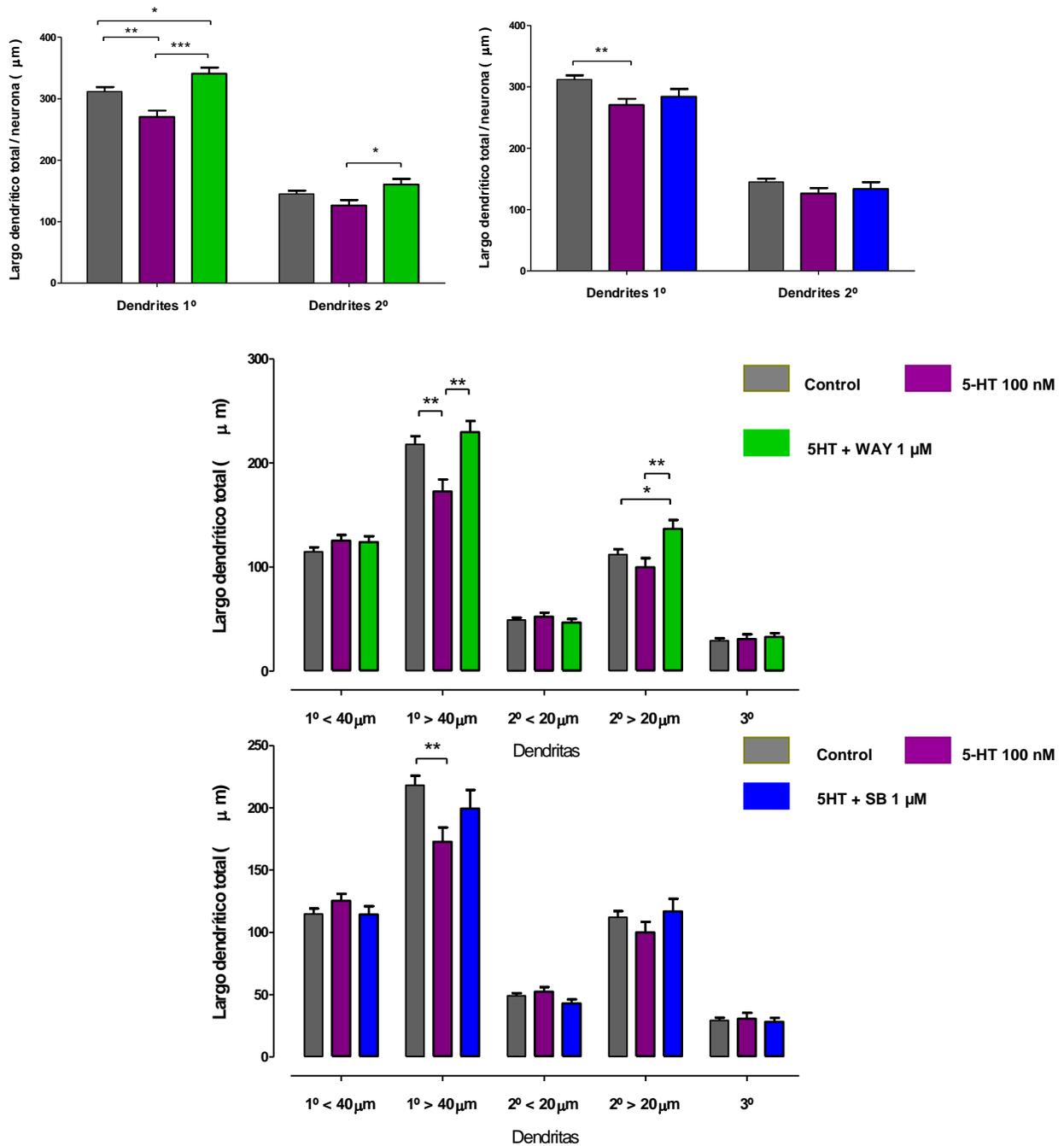
El estímulo con serotonina no produce modificaciones en el número de dendritas primarias y secundarias. Al analizar el efecto de este agonista sobre dendritas clasificadas de acuerdo a su largo, se observa que la serotonina incrementa el número de las primarias menores a 40  $\mu\text{m}$ . En cambio, reduce el número de dendritas primarias y secundarias mayores de 40  $\mu\text{m}$  y 20  $\mu\text{m}$  respectivamente, efecto prevenido sólo por el WAY-100635 (Figura 45).

El estímulo con serotonina promueve una disminución del largo total de dendritas primarias, sin afectar las secundarias, efecto prevenido sólo por el WAY-100635. Este efecto es observado en las dendritas primarias más largas ( $> 40 \mu\text{m}$ ) (Figura 46). Adicionalmente, se observó que el estímulo de la serotonina posterior al tratamiento con WAY-100635, aumenta significativamente el largo de dendritas secundarias mayores a 20  $\mu\text{m}$ , con respecto a la serotonina, sugiriendo que la acción del  $5\text{HT}_{1\text{A}}\text{-R}$  sobre la morfología se relaciona con una disminución del largo dendrítico (Figura 46). El estímulo con serotonina provoca una disminución del largo promedio de dendritas primarias y no de las secundarias. El efecto observado se refleja en una disminución del largo de dendritas primarias mayores a 40  $\mu\text{m}$ , efecto prevenido solo por el WAY-100635 (Figura 47).

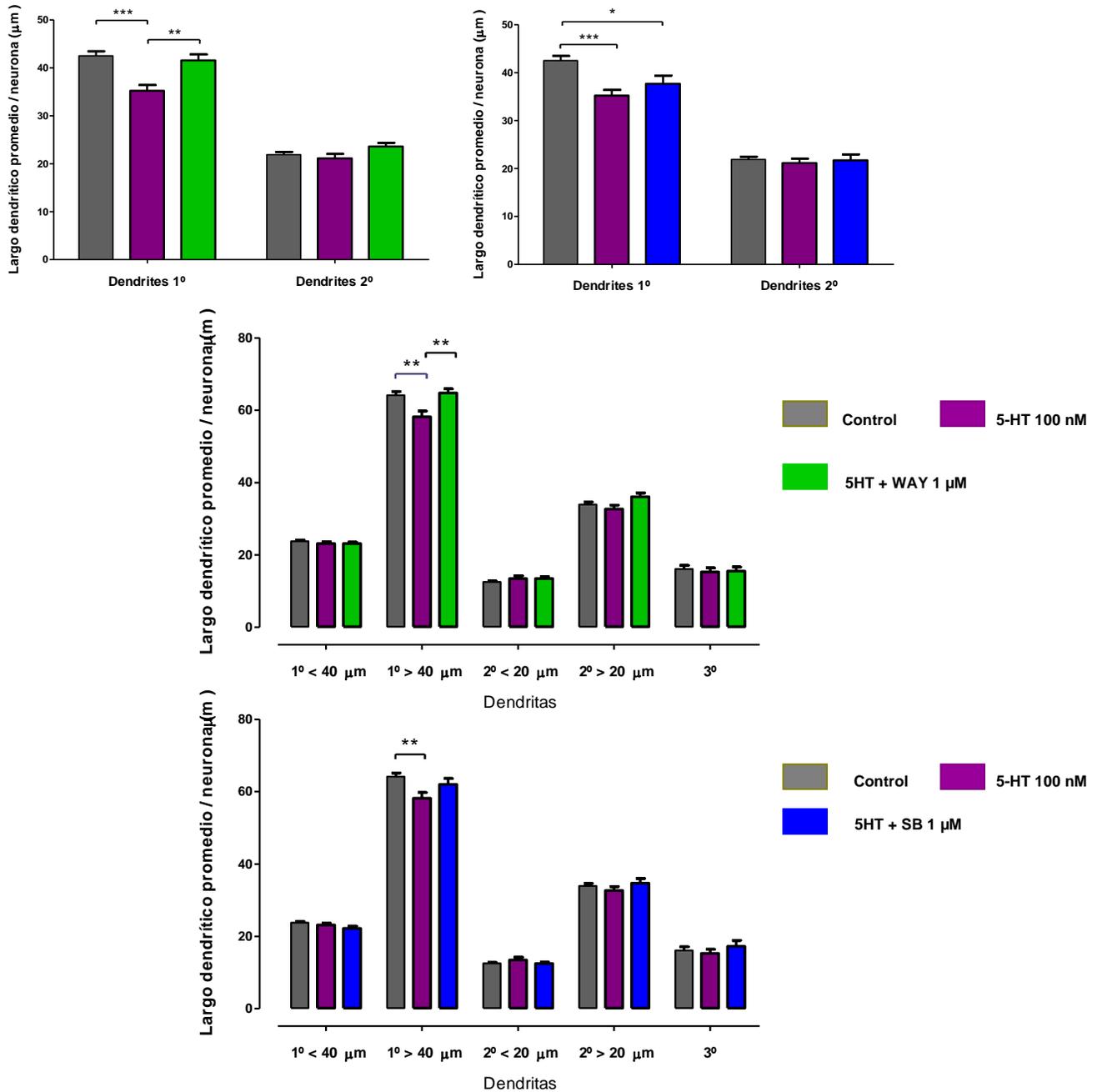
En resumen se puede sugerir que la activación del  $5\text{HT}_{1\text{A}}\text{-R}$ , disminuye el crecimiento de las dendritas primarias mayores de 40  $\mu\text{m}$  y probablemente, las secundarias mayores de 20  $\mu\text{m}$ .



**Figura 45. Efecto de la estimulación con 5-HT sobre el número de dendritas primarias, secundarias y terciarias por neurona a los 8 DIV.** Las neuronas a los 7 DIV se incubaron durante 24 h con 5-HT 100 nM. Los antagonistas WAY y SB se agregaron 30 min previo al agonista. Las neuronas se fijaron e inmuno tiñeron a los 8 DIV contra MAP2A y el citoesqueleto de F-actina se marcó con faloidina-rodamina. Las neuronas cuantificadas corresponden a tres cultivos independientes (control n=280; 5-HT 100 nM n=119; 5-HT + WAY n=152 y 5-HT 100 nM + SB269970 1μM n=81). Los valores del número dendrítico son entregados por el programa NeuronJ. Los datos representan el promedio ± E.E.M. Los datos se analizaron mediante el test de ANOVA para cada condición y seguido del post-test de Bonferroni. \*\*\* p<0,001, \*\* p < 0,01, \*p<0,05.



**Figura 46. Efecto de la estimulación con 5-HT sobre el largo dendrítico total por neurona a los 8 DIV.** Las neuronas a los 7 DIV se incubaron durante 24 h con 5-HT 100 nM. Los antagonistas WAY y SB se agregaron 30 min previo al agonista. Las neuronas se fijaron e inmuno tiñeron a los 8 DIV contra MAP2A y el citoesqueleto de F-actina se marcó con faloidina-rodamina. Para determinar el largo dendrítico total, se sumó el largo de las dendritas primarias, secundarias y terciarias de cada neurona. Las neuronas cuantificadas corresponden a tres cultivos independientes (control n=280; 5-HT 100 nM n=119; 5-HT + WAY n=152 y 5-HT 100 nM + SB269970 1μM n=81). Los valores del número dendrítico son entregados por el programa NeuronJ. Los datos representan el promedio  $\pm$  EEM y se analizaron mediante el test de ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis y post-test de Dunns. Los datos se analizaron mediante el test de ANOVA para cada condición y seguido del post-test de Bonferroni. \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ .



**Figura 47. Efecto de la estimulación con 5-HT sobre el largo dendrítico promedio por neurona a los 8 DIV.** Las neuronas a los 7 DIV se incubaron durante 24 h con 5-HT 100 nM. Los antagonistas WAY y SB se agregaron 30 min previo al agonista. Las neuronas se fijaron a los 8 DIV e inmuno tiñeron contra MAP2A y el citoesqueleto de F-actina se marcó con faloidina-rodamina. Para determinar el largo dendrítico promedio, se sumó el largo de las dendritas primarias, secundarias y terciarias de cada neurona y se dividió por el número de dendritas. Las neuronas cuantificadas corresponden a tres cultivos independientes (control n=280; 5-HT 100 nM n=119; 5-HT + WAY n=152 y 5-HT 100 nM + SB269970 1μM n=81). Los valores del largo dendrítico son entregados por el programa NeuronJ. Los datos representan el promedio ± EEM. Los datos se analizaron mediante el test de ANOVA para cada condición y seguido del post-test de Bonferroni. \*\*\* p< 0,001, \*\* p< 0,01, \*p< 0,05.

## 6. DISCUSIÓN

La 5-HT es el primer neurotransmisor sintetizado en el cerebro durante el desarrollo y se ha sugerido que ejerce acciones tróficas participando en la regulación del desarrollo del SNC. Asimismo, la 5-HT regula varios procesos como la proliferación, morfogénesis, migración neuronal y la formación de sinapsis entre otros (Buznikov y cols., 2001).

La diferenciación temprana del sistema serotoninérgico en el SNC sugiere que esta molécula modula el desarrollo de otros sistemas de neurotransmisión (Daubert y cols., 2010). Se ha documentado que en el tronco encefálico de rata, las neuronas serotoninérgicas pueden ser identificadas en E12 (Patel y cols., 2005) y donde la aparición de axones profusamente ramificados que proyectan a distintas áreas del cerebro, coincide con el inicio de los eventos de diferenciación y crecimiento neuronal (Patel y cols., 2005). A su vez, se ha documentado en roedores que la arborización de los terminales serotoninérgicos procede hasta el día 21 posnatal (Lidov y cols., 1982), período que coincide con los mayores niveles de serotonina en el cerebro (Buznikov y cols., 2001;Whitaker-Azmitia 2005).

Adicionalmente, la 5-HT se ha involucrado en varios aspectos del desarrollo neuronal, como en el crecimiento y complejidad dendrítica (van Kesteren y cols., 2003). Estas acciones pueden llevarse a cabo a través de la activación diferencial de los receptores serotoninérgicos y/o de sus efectores río abajo expresados en estadios apropiados o importantes en el desarrollo del cerebro (Bonnin y cols., 2006). En la actualidad existe escasa información sobre la contribución de los receptores serotoninérgicos en el desarrollo del SNC y más aún cuales son las cascadas transduccionales asociadas a esos procesos. Respecto a esto último, existen aproximaciones usando modelos celulares no neuronales modificados para que sobre-expresen los distintos subtipos de receptores serotoninérgicos; sin embargo estos modelos ampliamente utilizados han sido escasamente validados en neuronas y líneas neuronales (Albert y cols., 1999; Liu y cols., 1999; Cowen y cols., 1996; Hsiung y cols., 2005; Norum y cols., 2003; Lin y cols., 2003; Johnson-Farley y cols., 2005; Cowen y cols., 2005). Mediante el uso de cultivos primarios de neuronas hipocampales,

esta Tesis ha contribuido al conocimiento sobre el cambio de los niveles de los receptores 5HT<sub>1A</sub>, 5HT<sub>7</sub> y el acoplamiento a cascadas transduccionales durante la evolución del cultivo, como así mismo, el efecto de la activación de estos receptores sobre la morfología dendrítica, cambios que podrían homologarse a lo que ocurre *in vivo* durante el desarrollo embrionario.

#### 6.1 Distribución del receptor 5HT<sub>1A</sub> en cerebro durante el desarrollo y en adultez

Se ha demostrado que el transcrito del 5HT<sub>1A</sub>-R se detecta en cerebro fetal de roedores en el estadio E12, llegando a un nivel máximo en E15 para disminuir progresivamente a niveles muy bajos justo previo al nacimiento (E20) (Hillion y cols., 1993). Más aún, la expresión del 5HT<sub>1A</sub>-R durante el desarrollo embrionario coincide con la migración de neuronas jóvenes a la capa neural definitiva (Patel y cols., 2005). Se ha descrito que después del nacimiento, ocurre una expresión temprana del receptor a nivel del núcleo del rafe y además se observa transitoriamente en neuronas del cerebelo y motoras (Miquel y cols., 1994). A nivel hipocampal, las neuronas comienzan a expresar el 5HT<sub>1A</sub>-R alrededor del E16; justamente 1-2 días de haber completado la mitosis y en donde la mayoría de las células lo hacen antes de migrar a su estrato laminar (Patel y cols., 2005). Esto contrasta por ejemplo con el 5HT<sub>2</sub>-R que se expresa tardíamente durante el desarrollo posnatal (Patel y cols., 2005). Estos antecedentes han permitido plantear que durante el desarrollo embrionario la expresión temprana del 5HT<sub>1A</sub>-R en neuronas hipocampales ejercería diversas funciones asociadas a la formación del hipocampo, incluyendo la migración, diferenciación y crecimiento neuronal (Patel y cols., 2005).

Más aún, durante el desarrollo posnatal se detecta el 5HT<sub>1A</sub>-R en las espinas dendríticas y una redistribución desde el soma hacia las dendritas basales y apicales; fenómeno observado tanto en neuronas piramidales como las granulares del hipocampo (Patel y cols., 2005). Se ha planteado que la redistribución de los receptores podría responder a cambios en el tipo de acción de la 5-HT (Patel y cols., 2005). Es decir, la ubicación somática del receptor favorecería cambios en la expresión génica regulando el crecimiento celular y la

ubicación dendrítica regularía la morfología neuronal (Patel y cols., 2005). Adicionalmente, se ha descrito que la distribución somato-dendrítica del 5HT<sub>1A</sub>-R observada tempranamente en el hipocampo prevalece en animal adulto; localizándose también extra-sinápticamente (Riad y cols., 2000). Por otro lado, se ha sugerido que los receptores dendríticos en las neuronas hipocampales maduras permitiría disminuir la excitabilidad neuronal; evento que se relacionaría con el período en el cual las señales excitadoras se comienzan a integrar (Riad y cols., 2000).

En animal adulto, este receptor se detecta en la capa subgranular del GD del hipocampo y su activación aumenta la neurogénesis en esta área (Gould 1999). A su vez, el 5HT<sub>1A</sub>-R está profusamente distribuido en la corteza, septum, amígdala, núcleos talámicos e hipotálamo (Aznar y cols., 2003), lo que predice una acción sobre distintas funciones cerebrales. Estudios en animales knock-out para este receptor, evidencian un rol en la respuesta del estrés, en la generación de conductas tipo ansiosa, generación de comportamiento tipo depresivo y más aún, ejercería un rol primordial en la respuesta a fármacos antidepresivos que incrementan la acción de la 5-HT (Gross y cols., 2002). No obstante, las alteraciones en el comportamiento observadas en un sujeto adulto quizás se relacionan a modificaciones en las acciones reguladoras de la 5-HT sobre el remodelamiento dendrítico que ocurren durante el desarrollo.

## 6.2 Niveles y distribución celular del receptor 5HT<sub>1A</sub> en cultivos hipocampales

En esta Tesis se determinaron mediante inmuno-western los niveles del 5HT<sub>1A</sub>-R en cultivos hipocampales obtenidos de E18. En esta etapa del desarrollo en el hipocampo se ha detectado inmuno-reactividad del 5HT<sub>1A</sub>-R en las neuronas del cuerno de Ammon (CA) y en interneuronas presentes en el GD y del *stratum radiatum* y *stratum oriens* (Patel y cols., 2005). En esta Tesis, se determinó a los 2 DIV inmunoreactividad para el 5HT<sub>1A</sub>-R en extractos proteicos, cuyos niveles permanecieron constantes hasta los 14 DIV. Estos

resultados se condicen con la expresión temprana del receptor en neuronas del hipocampo en E16 (Patel y cols., 2005).

Con la idea de determinar cambios en el patrón de distribución del receptor en las neuronas, se realizaron ensayos de inmunocitoquímica y aunque fue dificultoso, se detectó en forma fiable una localización fundamentalmente somática a los 4 DIV. En cambio, este patrón varió a una localización somato-dendrítica a los 8 DIV; sugiriendo una polarización de la distribución del 5HT<sub>1A</sub>-R en función de la madurez del cultivo y en forma independiente de sus niveles. Aunque en esta Tesis no se exploraron los mecanismos asociados a esta polarización, recientemente se ha descrito que en cultivos primarios transfectados con el 5HT<sub>1A</sub>-R a los 7 DIV, presentan una distribución somato-dendrítica mediada por una proteína adaptadora denominada Yif1B (Carrel y cols., 2008). Esta proteína interactúa con la porción C-terminal del 5HT<sub>1A</sub>-R, permitiendo la localización dendrítica del receptor a través de la participación de pequeñas vesículas (Carrel y cols., 2008). Sin embargo, no se han descrito cambios en la expresión de la Yif1B durante estadios importantes para la polarización del 5HT<sub>1A</sub>-R.

### 6.3 Receptor 5HT<sub>1A</sub> y su asociación a cascadas transduccionales: modelos neuronales y no neuronales

Existen pocos antecedentes sobre cascadas transduccionales asociadas a la actividad de los receptores serotoninérgicos, tanto en neuronas como en tejido cerebral. Estudios electrofisiológicos han demostrado que la activación del 5HT<sub>1A</sub>-R en neuronas serotoninérgicas del núcleo del rafe e hipocámpales induce la activación de G $\alpha_{i/o}$ , liberación del complejo  $\beta\gamma$  y la activación de un canal rectificador de K<sup>+</sup> (GIRK), permitiendo una hiperpolarización celular (Polter y cols., 2010) (Figura 48). Adicionalmente, la administración prolongada de un agonista del 5HT<sub>1A</sub>-R a nivel del rafe resulta en la desensibilización mediada por la internalización del receptor (Riad y cols., 2001).

Por otro lado, se ha demostrado que la administración de agonista del 5HT<sub>1A</sub>-R BAY3702 promueve una reducción en la frecuencias de disparo de los potenciales de acción en neuronas piramidales CA3 y la administración mantenida del agonista durante 48 horas sigue produciendo el mismo efecto (Dong y cols., 1998). Los autores de este trabajo concluyen que al menos el receptor pos-sináptico en neuronas hipocampales no se desensibiliza y es probable que esté relacionado a la apertura del GIRKs (Dong y cols., 1998). De acuerdo a esta evidencia los receptores pos-sinápticos 5HT<sub>1A</sub> presentes en hipocampo no sufrirían desensibilización.

### 6.3.1 *Activación del receptor 5HT<sub>1A</sub> y su relación con la actividad adenilato ciclasa*

Mediante técnicas de transfección del 5HT<sub>1A</sub>-R humano en diferentes líneas celulares, ha permitido establecer los transductores asociados a la señalización del receptor. En la línea celular HEK293, la activación del 5HT<sub>1A</sub>-R reduce los niveles de AMPc a través de la inhibición de la AC tipo I efecto mediado por G $\alpha_0$  (Albert y cols., 1999). Sin embargo, se ha descrito en células HEK293 co-transfectadas con el 5HT<sub>1A</sub>-R y con la AC II que la adición del agonista aumenta los niveles de AMPc, efecto bloqueado por toxina pertussis lo que sugiere la participación de la proteína  $\alpha_i/0$  (Albert y cols., 1999). De forma similar, se ha descrito en líneas hipofisarias que expresan el 5HT<sub>1A</sub>-R, la ACII y G $\alpha_{i2}$  que el agonista promueve un aumento de los niveles de AMPc (Liu y cols., 1999). Interesantemente, en células HEK293 y mediante estudios de co-transfección con el dominio carboxilo terminal de GRK2, que actúa como un secuestrador de G $\beta\gamma$ , se demostró que la activación del 5HT<sub>1A</sub>-R libera el complejo  $\beta\gamma$ , activando a la ACII (Albert y cols., 1999). Este mismo trabajo, mostró que la co-transfección con ACII y sólo con G $\alpha_{i2}$ , promueve un aumento en los niveles de AMPc en forma independiente del agonista, sugiriendo una activación constitutiva del receptor dependiente de G $\alpha_{i2}$  (Albert y cols., 1999). En contraste, la presencia de G $\alpha_{i2}$  junto a G $\alpha_{i3}$  produce una disminución de los niveles de AMPc, sugiriendo que la acción de la G $\alpha_{i3}$  predomina sobre los efectos de la G $\alpha_{i2}$  (Liu y cols., 1999). De acuerdo a estos antecedentes, la señalización asociada al 5HT<sub>1A</sub>-R depende del

tipo de subunidades  $\alpha$  presentes en las células y más aún de la existencia de otras isoformas que pueden redireccionar el mecanismo de transducción de señales.

Adicionalmente, en hipocampo de rata *in vivo*, la activación del 5HT<sub>1A</sub>-R estimula la formación de AMPc (Cadogan y cols., 1994) efecto mediado por las subunidades G $\beta\gamma$  producto de la activación de proteínas Gai/G0 (Federman y cols., 1992); efecto similar al reportado en líneas celulares co-transfectadas con el receptor humano (Albert y cols., 1999). Mediante estudios inmunohistoquímicos, se ha demostrado que la ACII se localiza en el cuerpo celular y dendritas de las neuronas hipocampales (Baker y cols., 1999). A diferencia de los estudios realizados en líneas celulares, se desconoce la contribución del acoplamiento entre otras subunidades  $\alpha$  con la ACII en neuronas hipocampales. Por otro lado, respecto a la desensibilización del 5HT<sub>1A</sub>-R por estimulación persistente con agonistas, se ha informado que el receptor acoplado a AC y cuya activación disminuye los niveles de AMPc, no se desensibiliza en respuesta a la administración de un agonista durante 2 h (Varrault y cols., 1991).

### 6.3.2 Activación del receptor 5HT<sub>1A</sub> y su relación con la vía de las MAPK

Se ha demostrado en células CHO transfectadas con el 5HT<sub>1A</sub>-R humano que la 5-HT 100 nM y 8OH-DPAT 1 $\mu$ M promueven la activación de las ERK (Cowen y cols., 1996; Hsiung y cols., 2005); efecto prevenido por los antagonistas de este receptor como el MPPI y WAY-100635 (Cowen y col., 1996, Errico y col., 2001) y por toxina pertussis (Cowen y cols., 1996; Garnovskaya y cols., 1996; Hsiung y cols., 2005). Transfecciones similares del receptor pero realizadas en las células CHO-K1 que expresan las proteínas G<sub>i $\alpha$ 2</sub>, G<sub>i $\alpha$ 3</sub> y en menor cantidad la proteína G<sub>0 $\alpha$</sub> , mostraron que la 5-HT 1-10  $\mu$ M promueve la fosforilación de las ERK1/2 en Tyr<sup>204</sup> (Garnovskaya y cols., 1996; Garnovskaya y cols., 1998); efecto prevenido por inhibidores específicos de tirosinas quinasas tipo Src (Garnovskaya y cols., 1998).

Estos resultados en su conjunto demuestran en estas líneas celulares que la activación de las ERK a través del 5HT<sub>1A</sub>-R depende de una proteína G<sub>i</sub> o G<sub>o</sub>. Garnovskaya y cols., en el año 1996, determinaron en células CHO que la señalización del 5HT<sub>1A</sub>-R involucra a las subunidades G<sub>ai</sub>/0 y además a las subunidades βγ como transductores. Más aún, células CHO transfectadas con un miniconstruido que contiene el carboxilo terminal de βARK-1 (β1-CT) que actúa como secuestrador de las subunidades βγ, disminuye la activación de las ERK promovida por la 5-HT (Garnovskaya y cols., 1996). Esto indica que la liberación de las subunidades βγ inducida por la actividad del 5HT<sub>1A</sub>-R es requerido para la activación de las ERKs y más aún que en este proceso se induce la formación de un complejo multimolecular que incluye a Grb2, p46<sup>Shc</sup>, p52<sup>Shc</sup>, el cual es requerido para la activación de Sos, que a su vez es un activador de la vía ras/raf/MEK (Garnovskaya y cols., 1996) (Figura 48).

Adicionalmente, se demostró en células CHO-1A-27 que el aumento en los niveles de ERK1/2-p inducido por 5-HT, es prevenido por la adición de BABTA, un secuestrador de Ca<sup>2+</sup>, y un inhibidor de la proteína calmodulina (CaM) como las fenotiazinas (Della Rocca y cols., 1999). Así mismo, la inhibición de la CaM redujo el efecto de Src y Ras, pero no de Raf y MEK, sugiriendo que el complejo Ca<sup>2+</sup>/CaM se requiere río abajo de la activación de Ras, pero río arriba de la activación de Raf y MEK (Della Rocca y cols., 1999). Además, en células HEK293, se ha determinado que el 5HT<sub>1A</sub>-R induce la endocitosis mediada por clatrina asociada a dinamina y con la participación de β-arrestina; evento requerido para la activación de la ERK y que además requiere de CaM (Della Rocca y cols., 1999) (Figura 48). Respecto al rol de la CaM, se ha establecido que el tercer loop del receptor contiene dos sitios de unión para la CaM; sugiriendo una participación directa sobre la función del 5HT<sub>1A</sub>-R (Turner y cols., 2004). En resumen, la activación de las ERK en líneas celulares no neuronales es mediada a través de la internalización del receptor.

En células CHO, la adición de inhibidores de las PI3Ks (wortmannina y Ly29402), el uso de un dominante negativo de la subunidad p85 de la PI3K y un inhibidor de la fosfolipasa C específica para fosfatidilcolina (PC-PLC), han mostrado que la activación de la ERK

mediada por el 5HT<sub>1A</sub>-R participan las vías de la PI3K y PC-PLC (Cowen y cols., 1996;Garnovskaya y cols., 1996;Garnovskaya y cols., 1998;Hsiung y cols., 2005). En este mismo tipo celular, se ha mostrado que la activación de la caspasa-3 inducida por la privación de suero, se previene por agonistas del 5HT<sub>1A</sub>-R, fenómeno asociado a las vías PI3K-Akt y ERK. Además, en este estudio se determinó un aumento de la translocación de NFκB al núcleo, efecto atribuido a la acción de Akt sobre la degradación de IKBα (Hsiung y cols., 2005) (Figura 48).

Resumiendo la evidencia en estos modelos celulares no neuronales es que se puede plantear que tras la activación del receptor se induce la activación de αi/α0 y la liberación de βγ el cual forma un complejo macromolecular Grb2, p46<sup>Shc</sup>, p52<sup>Shc</sup> que activa Sos y la vía Ras-MEK-ERK a través de la internalización del receptor mediante un proceso dependiente de clatrina, dinamina y β-arrestina y de Ca<sup>2+</sup>/CaM. Por otra parte, las proteínas PI3K y PC-PLC contribuyen también a la activación.

Aunque las vías propuestas se han logrado en líneas celulares a través de la sobre-expresión del receptor humano junto con las proteínas αi y algunos efectores, el conocimiento de su operatividad en neuronas no ha sido del todo comprobado. En una línea celular de hipocampo HN2-5 inmortalizada y que sobre-expresa el 5HT<sub>1A</sub>-R, se observó que la estimulación con 1μM de 8OH-DPAT, aumenta lenta y sostenidamente la activación de las ERK, a través de un mecanismo que depende de la proteína Gαi/0 y de la activación de la PI3K (Adayev y cols., 1999) (Figura 48). Adicionalmente, estos autores demostraron que el 5HT<sub>1A</sub>-R activa la PLCβ y que a través de un aumento de Ca<sup>2+</sup>, conlleva a la inhibición de la caspasa-3 mediante la activación de las ERK y PKCα (Adayev y cols., 1999;Adayev y cols., 2003) (Figura 48). En los cultivos neuronales, la complejidad dendrítica aumenta a mayor tiempo del cultivo, por lo que hay que considerar el efecto del contacto neuronal producto del crecimiento dendrítico en la activación basal de las proteínas de interés y por lo tanto, es una variable que pudiese haber limitado la efectividad de los agonistas usados. Sin embargo, estos resultados negativos, están de acuerdo a lo observado por otros autores en cultivo primario de hipocampo, donde la activación de la ERK se asocia al 5HT<sub>7</sub>-R

(Errico y cols., 2001). Es decir la activación de los 5HT<sub>1A</sub>-R en cultivo primario neuronales no está acoplado a la activación de las ERK. En esta Tesis observamos en células de 7 DIV que la estimulación durante 5 y 15 min con 8OH-DPAT (agonista del 5HT<sub>1A</sub>-R y 5HT<sub>7</sub>-R) y 5-HT no aumenta en forma significativa los niveles de las ERK1/2 en cultivos realizados tanto a alta y baja densidad celular, debido posiblemente a una alta fosforilación basal de la ERK.

De acuerdo a la evidencia discutida, es probable que en el fenotipo neuronal no ocurra la asociación del 5HT<sub>1A</sub>-R con efectores asociados a la vía Ras-MEK-ERK a diferencia de lo que ocurre en modelos celulares no neuronales donde se sobre-expresa tanto el receptor como putativos efectores (Figura 48). Esto podría indicar que muchas de las relaciones establecidas en estos modelos corresponden más bien a un escenario favorable para la asociación de estos efectores con el receptor. Alternativamente, pudiese ser que muchos de los efectores descritos en líneas celulares estén asociados a otras vías de señalización en neuronas. Además, se podría aventurar que si ocurre la internalización del 5HT<sub>1A</sub>-R, ésta no mediaría la activación de las ERK a diferencia de lo descrito en células HEK293 (Della Rocca y cols., 1999) (Figura 48). Más aún, como se describió anteriormente, el 5HT<sub>1A</sub>-R localizado post-sinápticamente en neuronas del área hipocampal no se desensibiliza, quedando por establecer si este proceso ocurre o no en neuronas hipocampales en cultivo.

### 6.3.3 Activación del receptor 5HT<sub>1A</sub> y su relación con la vía de las PI3K-AKT-GSK-3β

La relación de causalidad entre la activación de la Akt y la fosforilación de la GSK-3β no ha sido muy documentada en líneas celulares y en cultivos primarios hipocampales. Aunque se ha descrito en roedor adulto que la activación *in vivo* del 5HT<sub>2A</sub>-R, acoplado a la activación de la fosfolipasa C, induce una reducción de la fosforilación de GSK-3β en la Ser<sup>9</sup> (Li y cols., 2004), no se ha demostrado en cultivos hipocampales la contribución de este receptor sobre la fosforilación basal e inducida de la GSK-3β. Estudios similares han demostrado que, luego de 30 minutos de la administración de 8OH-DPAT en ratón en

forma sistémica, se observa un aumento de la fosforilación en Thr<sup>308</sup> y en menor grado sobre la Ser<sup>473</sup> de la Akt obtenida de extractos de hipocampos (Polter y cols., 2012). Estos cambios se correlacionan con un incremento en la fosforilación inactivante de la GSK-3 $\beta$  (Li y cols., 2004; Polter y cols., 2011) que es atenuada por el WAY-100635, y no por un antagonista del 5HT<sub>7</sub>-R (SB258719), diferente al usado en esta Tesis. La interpretación de los estudios *in vivo* es compleja debido a que la administración sistémica puede involucrar tanto la activación de auto receptores localizados en neuronas serotoninérgicas a nivel del núcleo del rafe o de hetero receptores localizados en otras estructuras además del hipocampo. Por lo tanto, no se descarta la posibilidad de que las variaciones en la fosforilación de la GSK-3 $\beta$  sean producto de la contribución de efectos indirectos de receptores serotoninérgicos localizados en diferentes áreas cerebrales. Por lo tanto, el resultado observado de la administración sistémica de un agonista puede involucrar cambios en el estado de fosforilación de la GSK-3 $\beta$  producto de la activación o inhibición de vías asociadas a otros neurotransmisores. Estos resultados en su conjunto muestran que el agonista *in vivo* promueve la fosforilación de la Akt en la Thr<sup>308</sup>, residuo que es requerido para la fosforilación en Ser<sup>473</sup> confiriéndole una máxima actividad quinasas (Vanhaesebroeck y cols., 2000).

Demostramos en cultivos de 2 DIV que el agonista “selectivo” del 5HT<sub>1A</sub>-R, el 8OH-DPAT, aumenta la fosforilación en Ser<sup>473</sup> de la Akt en un 100% del control, pero desconocemos si esta se acompaña por cambios en la fosforilación de la Thr<sup>308</sup> tal como se ha reportado *in vivo* (Polter y cols., 2012). En neuronas más maduras, es decir a los 7 DIV, período en el cual se logra el estadio 4 asociado a una polarización funcional de los axones y dendritas, se observó un incremento de apenas un 50% del control, aunque significativo. Esto indica que a los 7 DIV existe un menor acoplamiento con la cascada que involucra a la Akt. Recientemente se ha descrito en cultivos hipocámpales de 17 DIV que la estimulación por 30 min con 5-HT 29 nM y 8OH-DPAT 10 nM incrementan 3 veces la fosforilación en la Ser<sup>473</sup> de la Akt con respecto al control efecto asociado al 5HT<sub>1A</sub>-R (Chen y cols., 2007). En cambio, se observa un aumento de un 30 % en la fosforilación inactivante de la GSK-3 $\beta$

(Chen y cols., 2007). Esta información apunta a que la Akt probablemente tiene otros efectores río abajo o que la fosforilación de la GSK-3 $\beta$  es regulada a través de la participación de fosfatasa.

En esta tesis se observó a los 2 DIV que el 8OH-DPAT aumenta la Akt-p, efecto antagonizado por el WAY y significativamente por el SB269970, sugiriendo que la activación del 5HT<sub>1A</sub>-R y del 5HT<sub>7</sub>-R puede ser responsable de este efecto. Una explicación plausible es que los cambios sobre la Akt-p sean producto de la activación del 5HT<sub>1A</sub>-R y que éste receptor en estadios tempranos del cultivo no presente una conformación apropiada para la unión a su antagonista específico (WAY-100635). En contraste, en período de mayor madurez del cultivo, es decir a los 7 DIV, el 8OH-DPAT estimula la fosforilación de la Akt, efecto dissociado de la fosforilación de la GSK-3 $\beta$ , pudiendo involucrar un receptor activado por el 8OH-DPAT y que mediante ensayos farmacológicos no corresponden al 5HT<sub>1A</sub>-R ni tampoco al 5HT<sub>7</sub>-R.

También se puede considerar que a mayor madurez del cultivo ocurre mayor contacto entre las neuronas modificando sustancialmente la respuesta a los agonistas. En apoyo a esta idea y en forma preliminar, demostramos en cultivos de menor densidad que la 5-HT a través del 5HT<sub>1A</sub>-R promueve la activación de la Akt. Esta idea se refuerza aún más por los hallazgos de Cowens y cols. en el año 2005, que utilizando neuronas hipocampales de 5-7 DIV, mostraron un aumento de la fosforilación en Ser<sup>473</sup> de la Akt por 5CT, 8OH-DPAT o 5-HT observándose el efecto máximo con 100 nM (Cowen y cols., 2005), concentración similar a la utilizada en esta Tesis. Adicionalmente, el 5-CT, es un agonista de los receptores 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>7</sub> con Ki= 1 nM y 0,1 nM respectivamente (Ruat y cols., 1993;Hensler y cols., 1996) y de acuerdo a la concentración utilizada por Cowens es probable que ambos receptores fuesen activados. Aunque estos autores demostraron que el efecto de 5-CT 100 nM fue prevenido por WAY-100635 1 $\mu$ M y no por SB269970 1 $\mu$ M, no describieron en los cultivos neuronales si el incremento en Akt-p inducido por 8OH-DPAT era bloqueado por WAY-100635 ó SB269970.

Aunque los resultados precedentes indican una relación entre la activación del 5HT<sub>1A</sub>-R y la fosforilación de la Akt, no se ha explorado que dependa de la actividad PI3K en forma similar a lo descrito en células CHO (Hsiung y cols., 2005) (Figura 48). Sin embargo, en tejido hipocampal el 5HT<sub>1A</sub>-R transduce a través de Gai/0 y por lo tanto, es factible que similar a lo reportado en líneas celulares no neuronales el complejo  $\beta\gamma$  active a la PI3K estimulando la fosforilación de la Akt. Será importante determinar a futuro en cultivos neuronales y mediante el uso de inhibidores específicos como la wortmanina, si la activación de la PI3K conduce a la activación de la Akt.

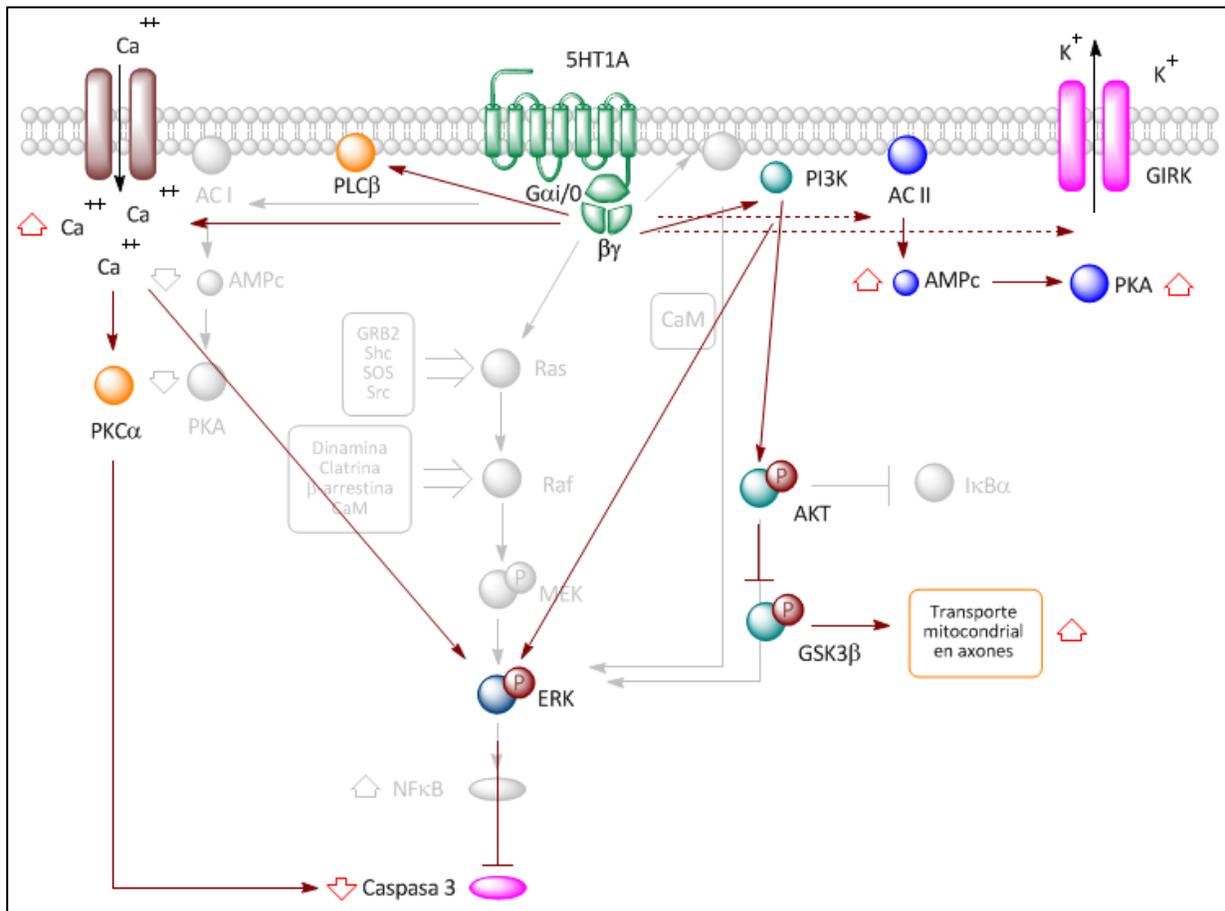
En esta Tesis observamos que el aumento de la Akt-p se acompaña por un leve incremento de la fosforilación en Ser<sup>9</sup> de su efector río abajo, la GSK-3 $\beta$ , efecto observado fundamentalmente a los 2 DIV y no a los 7 DIV utilizando 8OH-DPAT como agonista. Se puede argumentar que este leve incremento GSK-3 $\beta$ -p observado en cultivos inmaduros se debe a una alta fosforilación basal de esta enzima requerida para la definición de la polaridad neuronal. Esta proposición se fundamenta que a los 3 DIV los niveles basales de la Akt-p se acompañan por un incremento en la fosforilación inactivante de la GSK-3 $\beta$  en Ser<sup>9</sup>. En apoyo a esto, se ha reportado en cultivo de neuronas hipocampales que en la definición de la polaridad neuronal participa la vía Ras-PI3K-Akt-GSK3 $\beta$ -CRMP2 (Jiang y cols., 2005; Yoshimura y cols., 2006).

Más aún, debido a que la fosforilación de la Akt y su relación con la GSK-3 $\beta$ -p, cambia en función de los DIV y en virtud de las evidencias discutidas, en su conjunto sugieren cambios cíclicos en el acoplamiento del 5HT<sub>1A</sub>-R con esta vía durante la madurez del cultivo. La magnitud del cambio en los niveles de la Akt-p observados a los distintos DIV, pueden explicarse por el papel que desempeñaría el receptor en cada estadio en particular y que probablemente está en relación al acoplamiento a cascadas de señalización específicas. Será importante determinar si ocurre una redirección en la señalización asociada a las acciones de la Akt sobre sus efectores; como aquellos asociados a vías relacionadas con la supervivencia celular (Vanhaesebroeck y cols., 2000) y en función de su distribución a nivel neuronal. Es probable entonces que receptores somáticos estén en parte destinados a la

mantención de la sobrevivencia neuronal y será importante determinar por ejemplo si agonistas 5HT<sub>1A</sub>-R median neuroprotección frente a insultos. En contraste aquellos receptores dendríticos puede que estén más bien relacionados a cambios locales que regulan la excitabilidad celular (GIRK) (Saenz del Burgo y cols., 2008).

Interesantemente, en cultivos primarios corticales de rata, se ha descrito recientemente que el 5HT<sub>1A</sub>-R promueve cambios dinámicos que median el transporte de vesículas que contienen las subunidades NR2B del receptor NMDA, lo cual resulta en una reducción en la conductancia del canal (Yuen y cols., 2005). Por otro lado, y aunque en esta tesis no se evaluó la presencia de los receptores en los axones, será importante establecer su localización, como así mismo el efecto de la activación del 5HT<sub>1A</sub>-R sobre la definición axonal. Interesantemente, se ha relacionado que el 5HT<sub>1A</sub>-R promueve el movimiento mitocondrial en axones de neuronas hipocámpales a los 17 DIV efecto mediado por la inhibición de la GSK-3 $\beta$  promovida por la Akt (Chen y cols., 2007) (Figura 48).

En resumen, en esta tesis se ha presentado evidencia de la expresión temprana del 5HT<sub>1A</sub>-R y una distribución diferencial durante la maduración del cultivo, que probablemente daría cuenta de las acciones de la 5-HT durante el desarrollo del cerebro como es la migración, diferenciación y crecimiento neuronal (Gaspar y cols., 2003).



**Figura 48. Vías transduccionales asociadas a la activación del receptor serotoninérgico 5HT<sub>1A</sub> en líneas celulares neuronales y no neuronales.** En color se destacan los efectores del heterorreceptor del 5HT<sub>1A</sub> descritos en neuronas y en fondo de agua aquellos efectores descritos en líneas celulares no neuronales (HEK293, CHO). En neuronas, la activación del receptor promueve a través de la liberación de  $\beta\gamma$  un aumento en la actividad de la ACII lo que conlleva a un incremento de los niveles de AMPc y activación de la PKA. El complejo  $\beta\gamma$  a su vez participa en la activación de la vía PI3K-Akt, la cual promueve un aumento de los niveles de ERK-p. Más aún, la vía PI3K-Akt-GSK-3 $\beta$  participa en un incremento del transporte mitocondrial en axones. Adicionalmente, la estimulación del receptor promueve un aumento de  $\text{Ca}^{+2}$ , que a su vez contribuye en la activación de PKC $\alpha$  y ERK, lo que conlleva a una disminución de caspasa3. Además, la liberación del complejo  $\beta\gamma$  participa en la activación de un canal rectificador de  $\text{K}^{+}$  (GIRK), permitiendo una hiperpolarización celular. Respecto a lo descrito en líneas celulares, la asociación entre la actividad del receptor con la reducción de la actividad de ACI operaría solo en el caso del autorreceptor, como por ejemplo en las neuronas del rafe. En líneas no neuronales se asocia la activación del receptor con la señalización Ras-Raf-MEK-ERK; vía normalmente asociada a factores tróficos en neuronas.

#### 6.4 Distribución del receptor 5HT<sub>7</sub> en cerebro adulto

El gen del 5HT<sub>7</sub>-R genera variantes de *splicing* alternativo que varían en su porción carboxilo terminal, de esta forma se generan cuatro isoformas de receptor (Heidmann y cols., 1997), las cuales se asocian a la proteína Gs produciendo señalización a través del aumento en los niveles de AMPc y la activación de la PKA (Bard y cols., 1993) (Figura 49).

Existe información de que las tres isoformas del 5HT<sub>7</sub>-R descritas en humano, tienen propiedades farmacológicas y de señalización similares (Jasper y cols., 1997). Los transcritos del 5HT<sub>7</sub>-R están presentes principalmente en hipotálamo, tálamo, hipocampo y corteza (Hedlund y cols., 2004). Adicionalmente, estos transcritos tienen una colocación con los sitios de unión a ligandos del 5HT<sub>7</sub>-R, sugiriendo una localización postsináptica de éstos (Varnas y cols., 2004). Además, existe colocación entre el 5HT<sub>7</sub>-R y las varicosidades que contienen 5-HT (Kobe y cols., 2012). En ratas en desarrollo y fundamentalmente en el hipotálamo se detecta inmuno-reactividad para este receptor a nivel del citoplasma en inclusiones denominados cuerpos estigmoides, estructuras involucradas en el desarrollo del dimorfismo sexual (Hedlund y cols., 2004).

En roedor adulto, la inmunoreactividad para el 5HT<sub>7</sub>-R está presente en todas las áreas CA del hipocampo principalmente en dendritas y en axones de las interneuronas GABA-érgicas (Hedlund y cols., 2004). Se ha determinado la densidad del 5HT<sub>7</sub>-R en preparaciones de membranas obtenidas del cerebro (Hedlund y cols., 2004); sin embargo estos estudios no dan información sobre la distribución neuroanatómica de estos receptores. Bonaventure y cols. en el año 2002, determinaron la distribución neuroanatómica de los 5HT<sub>1A</sub>-R y 5HT<sub>7</sub>-R mediante la técnica de radioligando utilizando el agonista 8OH-DPAT [<sup>3</sup>H] (Bonaventure y cols., 2002). Debido a que este ligando reconoce a ambos receptores, este grupo utilizó animales knock-out para los receptores 5HT<sub>1A</sub>-R y 5HT<sub>1B</sub>-R en combinación con antagonistas selectivos (SB269970 para el 5HT<sub>7</sub>-R, WAY-100135 para el 5HT<sub>1A</sub>-R) para discriminar la distribución de cada receptor. Mediante esta aproximación experimental

se confirmó la distribución neuroanatómica obtenida para el 5HT<sub>7</sub>-R mediante análisis de inmunohistoquímica (Hedlund y cols., 2004); vale decir está presente en el tálamo, hipotálamo, hipocampo, amígdala, septum y corteza (Bonaventure y cols., 2002).

Respecto a la función, el 5HT<sub>7</sub>-R está involucrado en el control del ciclo circadiano (Matthys y cols., 2011), en la hipotermia, favorece el condicionamiento contextual al miedo y, mediante estudios electrofisiológicos se ha demostrado que inhibe las corrientes de potasio activadas por calcio en el área CA3 del hipocampo (Bacon y cols., 2000). Existe considerable información que involucra la participación del 5HT<sub>7</sub>-R en depresión (Hedlund 2009). Tanto el bloqueo farmacológico como la inactivación de este receptor ejerce acciones tipo antidepresivas en animales de experimentación (Hedlund 2009). Resulta de particular interés la potenciación de la acción de los fármacos antidepresivos observada tras la coadministración con antagonistas del 5HT<sub>7</sub>-R (Hedlund 2009).

#### 6.5 Expresión y distribución celular del receptor 5HT<sub>7</sub> en cerebro en desarrollo pre y posnatal

A nivel hipocampal, se ha descrito en estadíos tempranos posnatal P2 y P6, niveles altos del mRNA del 5HT<sub>7</sub>-R los que decaen sustancialmente en períodos de mayor desarrollo (P12-P90) (Kobe y cols., 2012). Adicionalmente, en forma cualitativa se ha descrito en el hipocampo una inmunoreactividad para el 5HT<sub>7</sub>-R en estadíos P1 y éste desaparece en P7 y luego se vuelve a detectar desde P15 hasta la adultez (Muneoka y cols., 2003). Otros estudios de inmunohistoquímica revelan una mayor inmunoreactividad del 5HT<sub>7</sub>-R en la región CA1 del hipocampo, justamente en estadíos en que hay un incremento en los niveles del transcrito en P2 y P6; cambios que son coincidentes con el aumento de los niveles del transcrito de Gα<sub>12</sub> (Kobe y cols., 2012). Las variaciones en los niveles del receptor durante el período posnatal pueden estar en relación con su función sobre el desarrollo del hipocampo principalmente en las primeras etapas del desarrollo cerebral.

Se ha descrito en cultivos hipocampales obtenidos de P1-P2 que el receptor expresado transcientemente está presente en somas y neuritas, localizándose además con Gα<sub>12</sub>

endógena (Kvachnina y cols., 2005). Mediante western, en esta Tesis se detectaron dos isoformas del 5HT<sub>7</sub>-R que se generan por *splicing* alternativo (Heidmann y cols., 1997). Aunque estas isoformas no variaron una con respecto de la otra en los períodos analizados, observamos que ambas isoformas aumentan significativamente entre los 2 y 14 DIV. Además, determinamos una distribución somato-dendrítica del receptor a los 4 y 8 DIV. El incremento en los niveles de las isoformas y su localización somato-dendrítica puede jugar un papel importante en el desarrollo de la morfología neuronal.

## 6.6 Receptor 5HT<sub>7</sub> y activación de cascadas transduccionales: modelos neuronales y no neuronales

### 6.6.1 *Activación del receptor 5HT<sub>7</sub> y su relación con la vía de las MAPK*

De forma similar al 5HT<sub>1A</sub>-R, las vías asociadas a la activación del 5HT<sub>7</sub>-R han sido obtenidas mediante la sobre-expresión del receptor humano en líneas celulares no neuronales. Es así que, en células HEK-293 que expresan la AC IV y co-expresan establemente el 5HT<sub>7A</sub>-R, el estímulo con 5-HT promueve un aumento de los niveles de AMPc (Baker y cols., 1999). En el estudio de Norum y cols., 2003, realizados en células HEK-293, carentes de receptores serotoninérgicos y transfectadas con el 5HT<sub>7</sub>-R junto con Gas, la 5-HT 10 μM aumentó los niveles de ERK-p a los 5 min en forma transitoria (Norum y cols., 2003). La activación de las ERK en estas células se previno parcialmente por el tratamiento con un inhibidor de la PKA y totalmente con uno de la MEK. Adicionalmente, en este mismo trabajo se demostró que la activación de la ERK es dependiente de Ras e independiente de Rap1 (Norum y cols., 2003). Aunque en esta línea celular se ha realizado un análisis de las vías asociadas a la activación del receptor, en modelos celulares neuronales solo se ha establecido una relación menos robusta. En relación a esto, la línea celular PC12 no diferenciada y transfectadas transcientemente con el 5HT<sub>7</sub>-R humano, ha sido utilizada como modelo celular para estudiar el acoplamiento del 5HT<sub>7</sub>-R a la activación de la ERK (Figura 49). La estimulación, de estas células, durante 5

min con 5-CT 300 nM, un agonista selectivo para los receptores 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>7</sub>, promueve un aumento en la fosforilación de las ERKs, efecto prevenido por el antagonista específico del 5HT<sub>7</sub>-R, SB269970 (Lin y cols., 2003). Más aún, la estimulación con concentraciones más altas de 5-CT como 1  $\mu$ M, no produce cambios en los niveles de la ERK-p. Los autores no discuten sobre este efecto; sin embargo se podría plantear que a esta concentración el 5HT<sub>7</sub>-R se desensibiliza y/o que la activación de la ERK mediada a través del 5HT<sub>7</sub>-R es inhibida en algún punto de la vía mediante la activación del 5HT<sub>1A</sub>-R.

El estudio del acoplamiento del 5HT<sub>7</sub>-R con la vía de la ERK ha mostrado un incremento de los niveles de AMPc en asociación a la activación de la PKA en las células PC12 (Lin y cols., 2003). Más aún, a través de la inhibición de la PKA se demostró que esta quinasa activa parcialmente a la ERK mediada por la activación del 5HT<sub>7</sub>-R (Lin y cols., 2003). Adicionalmente, el pre-tratamiento de células PC12 con pCPT-cAMP, un análogo a AMPc que activa tanto a la PKA como a Epac, factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF), produjo un aumento en la activación de la ERK (Lin y cols., 2003). Por otra parte, en PC12 transfectadas con cDNA para Epac1, muestran una potenciación del efecto del 5-CT sobre la activación de ERK; planteándose una relación de causalidad entre el aumento inducido de AMPc por activación del receptor, activación de Epac y de las ERKs (Lin y cols., 2003; Johnson-Farley y cols., 2005) (Figura 49). Sin embargo, en PC12 no se ha demostrado si este efecto es dependiente de Rap/Ras/ERK a diferencia de lo observado en células HEK293 (Norum y cols., 2003) (Figura 49).

Adicionalmente, en células PC12 la estimulación del 5HT<sub>7</sub>-R con 5-CT induce un incremento pequeño de Ca<sup>2+</sup> citosólico (Johnson-Farley y cols., 2005). Más aún, la estimulación con 5-CT, pero en presencia de quelantes de calcio extracelular o con Tapsigardina que permite una depleción lenta de los reservorios intracelulares de Ca<sup>2+</sup>, promueven un mayor aumento en los niveles de la ERK-p (Johnson-Farley y cols., 2005). Aunque estos autores no discuten sobre el origen del Ca<sup>2+</sup> (Lin y cols., 2003), se puede postular que el incremento del Ca<sup>2+</sup> citosólico inhibe de alguna forma las vías que conducen a la ERK-p (Johnson-Farley y cols., 2005) quizás a través de la inhibición de la AC VI presente en las PC12, y que al existir una menor producción de AMPc y se produzca

reducción en la activación de Epac y por ende de las ERKs, efecto que se ha reportado en otros sistemas celulares (Chern y cols., 1995) (Figura 49).

A diferencia de lo descrito en PC12, la activación de ERK mediada a través del 5HT<sub>7</sub>-R en neuronas hipocampales, no depende de un incremento del Ca<sup>2+</sup> intracelular (Lin y cols., 2003). Se ha descrito en neuronas hipocampales mantenidas por 5-7 DIV, que el 5-CT no promueve la activación de las vías de las ERKs (Cowen y cols., 2005). Esto contrasta con lo observado en neuronas con mayor tiempo de cultivo; es decir, entre 12-16 DIV donde existe un aumento de ERK-p mediado por el 5HT<sub>7</sub>-R, siendo este efecto además insensible a toxina pertúsica, descartándose entonces la contribución del complejo 5HT<sub>1A</sub>-R/G $\alpha$ i (Errico y cols., 2001). Estos autores apoyan la participación del 5HT<sub>7</sub>-R en la activación de las ERK basándose en el uso del 5-CT y en que el 8OH-DPAT tiene una potencia 200 veces menor con respecto a la 5-HT para producir el efecto, lo cual concuerda con la afinidad del 5HT<sub>7</sub>-R por estos agonistas. En esta Tesis observamos en células de 7 DIV que, la estimulación durante 5 y 15 min con los agonistas serotoninérgicos (8OH-DPAT y 5-HT), no aumenta en forma significativa los niveles fosforilados de la ERK1/2. La diferencia descrita por otros autores a mayores DIV puede ser explicado por el aumento en la densidad del receptor observada en esta Tesis donde ambas isoformas del 5HT<sub>7</sub>-R aumentan 6 veces con respecto a los 2 DIV. Esto podría sugerir que el acoplamiento del receptor a la vía de las ERK o bien que la cuantía del efecto, depende de la densidad de este receptor.

#### 6.6.2 Activación del receptor 5HT<sub>7</sub> y su relación con la vía PI3K-AKT-GSK-3 $\beta$

Adicionalmente, en células PC12 transfectadas con el 5HT<sub>7</sub>-R humano y estimuladas con 5-CT 300 nM, se ha descrito un aumento en los niveles de la Akt-p además de la ERK-p, efectos antagonizados por un antagonista selectivo para el receptor (Johnson-Farley y cols., 2005). Más aún, en este estudio se mostró que la activación de la Akt es independiente de Epac pero completamente dependiente de la actividad de la PI3K (Johnson-Farley y cols., 2005). Estos mismos autores muestran que la activación de la Akt requiere Ca<sup>2+</sup> y AMPc

aunque no se ha precisado el mecanismo asociado (Johnson-Farley y cols., 2005). Se podría postular que incrementos en el calcio citosólico puedan regular de alguna forma la actividad de la PI3K y por ende la actividad de la Akt. Alternativamente, en otros tipos celulares no neuronales se ha descrito que la CaM quinasa-quinasa (CAMKK) activa a la Akt mediante su fosforilación en Thr<sup>308</sup> y en una forma independiente de la PI3K (Vanhaesebroeck y cols., 2000).

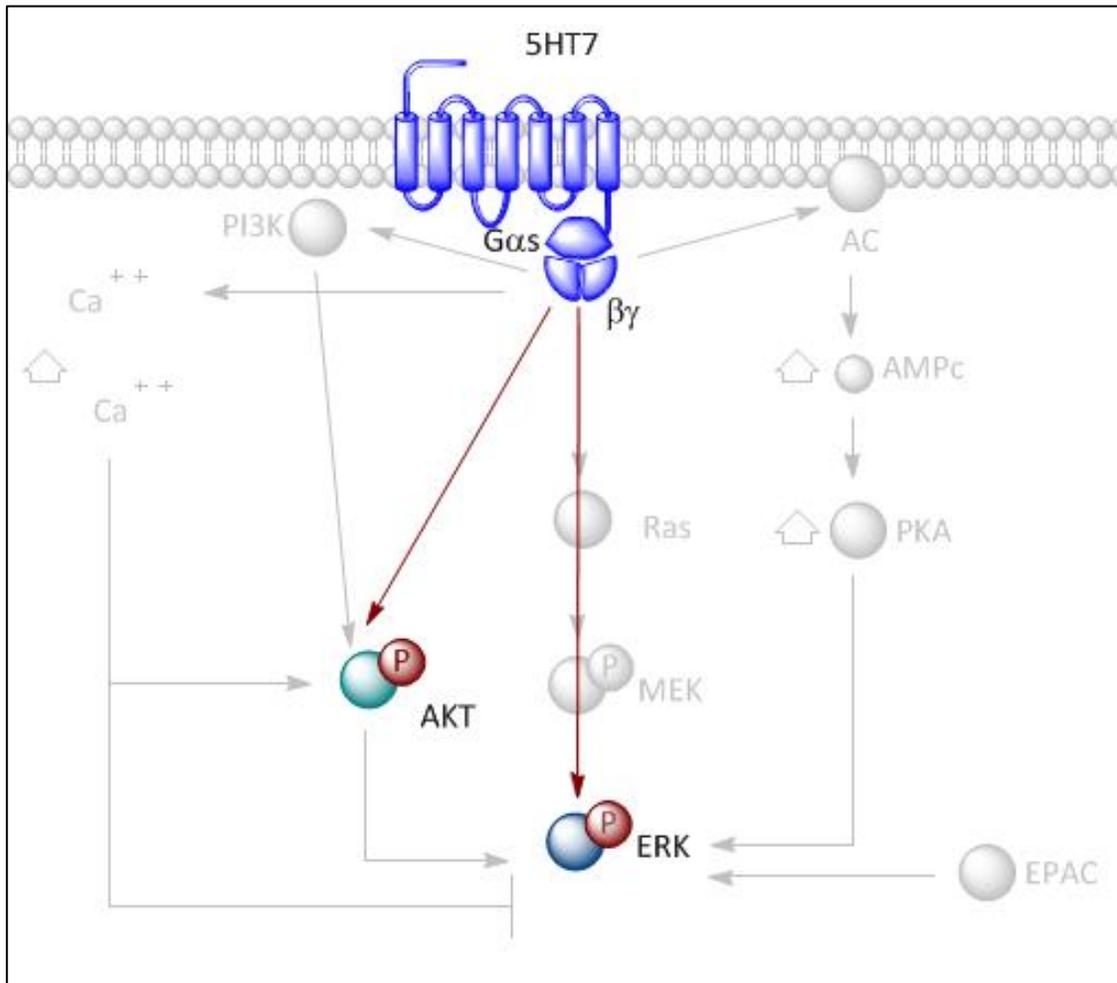
En esta tesis se observó a los 2 DIV que el 8OH-DPAT aumentó la Akt-p efecto antagonizado en forma significativa por SB269970 1  $\mu$ M, sugiriendo la participación del 5HT<sub>7</sub>-R en la activación de la Akt la que no se correlacionó con cambios significativos en el estado de fosforilación de la GSK-3 $\beta$ . Por otra parte, se deberá precisar si la activación de la Akt procede a través de un mecanismo de transactivación que involucre receptores del tipo tirosina quinasa. En relación a esto, ha descrito *in vivo* que el incremento de la serotonina a través del uso de bloqueadores del transportador de 5-HT, promueve un aumento de los niveles del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), neurotrofina que induce la activación de su receptor y la activación de la vía PI3K/AKT (Martinowich y cols., 2008). Será importante determinar si la activación del 5HT<sub>7</sub>-R media la expresión y secreción del BDNF en nuestros cultivos, y más aún mediante la adición de inhibidores de los receptores acoplados a tirosina quinasa se podría discernir entre una activación directa de la Akt mediada por el receptor o bien a través de un proceso de transactivación.

En contraste, en períodos de mayor madurez del cultivo, es decir a los 7 DIV, el 8OH-DPAT estimula la fosforilación de la Akt en Ser<sup>473</sup>, efecto dissociado de la fosforilación de la GSK-3 $\beta$ , siendo este efecto insensible a los antagonistas utilizados. Se ha descrito que el 8OH-DPAT puede unirse con baja afinidad a otros receptores como  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ - adrenérgicos y el receptor de Dopamina tipo 2 (D2) en núcleo del rafe y en hipocampo (Assie y cols., 2000). A futuro será necesario precisar si el 8OH-DPAT media la activación de la Akt a través de los receptores  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ - adrenérgicos y D2.

## **6.7 Factores que dificultan el conocimiento del acoplamiento entre receptores serotoninérgicos y sus efectores en neuronas**

Unas de las dificultades en poder dilucidar cascadas transduccionales asociadas a la activación de receptores serotoninérgicos es que estos receptores comparten una alta homología entre ellos y por tanto los agonistas y antagonistas para estos receptores ejercen acciones no específicas. A modo de ejemplo, el 8OH-DPAT es capaz de activar diversos subtipos de receptores serotoninérgicos y en el caso de esta Tesis, se ha comprobado que puede activar los 5HT<sub>1A</sub>-R y 5HT<sub>7</sub>-R.

En relación a la descripción de efectores tras la activación de los 5HT<sub>1A</sub>-R y 5HT<sub>7</sub>-R, diferencias en la densidad del receptor y población de proteínas G pueden posiblemente explicar las diferencias observadas en estudios realizados en cultivos primarios de neuronas hipocampales y líneas celulares transfectadas con los receptores. De acuerdo a esto, los hallazgos obtenidos en líneas no neuronales para estos receptores han sido inadecuadamente extrapolados a sistemas neuronales, induciendo una mayor confusión y discrepancia en la literatura.



**Figura 49. Vías transduccionales asociadas a la activación del receptor serotoninérgico 5HT<sub>7</sub> en líneas celulares neuronales y no neuronales.** En color se destacan los efectores del 5HT<sub>7</sub>-R descritos en neuronas hipocampales. En fondo de agua se destacan los efectores descritos en modelos no neuronales como HEK293 y modelos neuronales como las células PC12 diferenciadas. Se observa que la activación del receptor en neuronas hipocampales promueve un aumento de los niveles de Akt-p y ERK-p. En células HEK293, el estímulo del receptor promueve, mediante la liberación de βγ, un aumento en la actividad de la ACIV lo que conlleva a un incremento de los niveles de AMPc y activación de PKA, la que a su vez estimula a la ERK. Por otro lado, βγ promueve un aumento de ERK-p, a través de la activación de las proteínas Ras y MEK. En células PC12 el estímulo del receptor promueve un aumento de ERK-p; efecto dependiente de AMPc-PKA-Epac e inhibido por un aumento de Ca<sup>2+</sup>. Además, el estímulo del receptor promueve el aumento de Akt-p; efecto dependiente de AMPc, Ca<sup>2+</sup> y PI3K. Sin embargo, en este modelo neuronal no se estableció si la activación de la ERK es dependiente de Ras y MEK.

## 6.8 Rol de la serotonina en la regulación de la morfología neuronal

Uno de los objetivos de esta Tesis fue determinar el efecto de la activación de receptores serotoninérgicos sobre variaciones en el número y largo de las dendritas primarias, secundarias y terciarias. Para lograr este objetivo fue un requisito disponer de células que no formasen contacto entre sí cultivando a baja densidad celular y en condiciones en las cuales las células fuesen viables en ausencia del componente glial.

### 6.8.1 *El receptor inotrópico 5HT<sub>3</sub> y metabotrópico 5HT<sub>4</sub> regulan la morfología neuronal*

En relación a la función de la serotonina sobre la morfología neuronal, se ha descrito que la depleción farmacológica de la serotonina durante el desarrollo embrionario (E12-E17), inhibe el crecimiento dendrítico y la arborización de neuronas piramidales de la corteza, sugiriendo que la serotonina promueve la formación dendrítica de estas neuronas (Vitalis y cols., 2007). Estudios más recientes, han involucrado la participación del 5HT<sub>3</sub>-R, en la formación de dendritas y axones en la mayoría de la interneuronas GABA-érgicas presentes en la corteza, específicamente positivas para la colecistoquinina y el péptido intestinal vasoactivo (Hayashi y cols., 2010). El 5HT<sub>3</sub>-R es un canal iónico no selectivo para Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, el cual media la neurotransmisión rápida en el cerebro y sufre una rápida desensibilización (Boess y cols., 1995). Aunque diversos estudios han indicado que la estimulación de este receptor en el hipocampo regula la liberación de serotonina *in vivo* (Martin y cols., 1992), no se ha asociado su actividad a las cascadas transduccionales que involucren directa o indirectamente modificaciones en el citoesqueleto y que podrían dar cuenta de su participación en la formación de extensiones en las interneuronas GABA-érgicas corticales.

El otro receptor serotoninérgico involucrado con la morfología neuronal es el 5HT<sub>4</sub>-R, que está positivamente acoplado a la AC y cuya actividad incrementa la excitabilidad neuronal (Bockaert y cols., 2008). La densidad de este receptor es constante durante el desarrollo posnatal (Kobe y cols., 2012) y presenta una alta expresión en los ganglios basales,

hipocampo (CA1 y subiculum) y corteza (Bockaert y cols., 2008). Ponimaskin y cols. en el año 2002, mostraron que la activación específica del 5HT<sub>4</sub>-R produce cambios sobre la morfología neuronal. Utilizando líneas celulares NIE-115 transfectadas con el receptor 5HT<sub>4</sub>-R como modelo de estudio, demostraron que neuronas hipocampales (P1-P2) al ser estimuladas por 20 horas con BIMU8, agonista selectivo para el 5HT<sub>4</sub>-R, presentan una reducción del número de neuritas; efecto revertido por GR113808, antagonista específico para el 5HT<sub>4</sub>-R (Kvachnina y cols., 2005). Se ha descrito que el 5HT<sub>4A</sub>-R se acopla a Gα13 y que el efecto inductor de la retracción de neuritas y redondeo celular es dependiente de la activación de RhoA (Kvachnina y cols., 2005). En relación a esto, las Gα12 y Gα13 (Strathmann y cols., 1991) participan en la formación de fibras de estrés en células de fibroblasto de ratón (3T3) (Buhl y cols., 1995) y en células PC12 promueven la retracción de neuritas (Katoh y cols., 1998).

Adicionalmente se ha documentado que diversas GTPasas pequeñas se asocian a la señalización mediada por Gα12, las cuales además de regular la expresión de genes, controlan el citoesqueleto de actina. A su vez, se acoplan a proteínas efectoras como LIMK las que *in vitro* se ha demostrado que regulan la polimerización de la actina mediante la fosforilación e inactivación de factores depolimerizantes de la actina ADF/cofilina (Arber y cols., 1998; Yang y cols., 1998); hechos que podrían ser determinantes en la formación y mantención de dendritas y espinas dendríticas en animal adulto.

#### 6.8.2 *Receptores 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>7</sub>: relación con cambios en la morfología neuronal*

Se ha determinado en líneas celulares de fibroblasto NIH-3T3 y mediante estudios de transfección con el 5HT<sub>7</sub>-R, que la presencia de 5-HT induce un aumento de aproximadamente 2 veces la actividad de la RhoA y de la Cdc42 en comparación al control (Kvachnina y cols., 2005), efectos asociados a un aumento en la actividad de Gα12. En estas mismas células transfectadas con el 5HT<sub>7</sub>-R y mediante el uso de dominantes negativos para estas GTPasas se demostró que la actividad de la Cdc42 se asocia a la

formación de filopodios; en cambio la actividad de la RhoA promueve el efecto contrario (Kvachnina y cols., 2005).

Adicionalmente, en líneas celulares neuronales en cultivo se ha establecido que la activación de Rac1 y Cdc42 promueve la ramificación y extensión de neuritas respectivamente, mientras que la activación de RhoA causa la retracción de neuritas (Govek y cols., 2005). Sin embargo, la relación entre la estimulación de los receptores serotoninérgicos, cambios en la actividad de las GTPasas pequeñas y la morfología neuronal ha sido escasamente documentada. En neuronas hipocampales obtenidas de ratas P1-P2 se ha demostrado la colocalización de la  $G\alpha_{12}$  con el 5HT<sub>7</sub>-R en somas y neuritas (Kvachnina y cols., 2005). En este mismo estudio, y en neuronas con 4-18 horas de cultivo se mostró que al ser estimuladas por 20 horas con 5-CT 1  $\mu$ M un agonista del 5HT<sub>7</sub>-R (estadio 2-3), presentan un aumento en el largo de neuritas. Este efecto es revertido por el antagonista SB269970 100 nM, sin observarse cambios en el número de neuritas. Adicionalmente, en neuronas hipocampales transfectadas con 5HT<sub>7</sub>-R-GFP se observó un incremento en el largo neurítico tras la adición de 5HT 1  $\mu$ M (Kvachnina y cols., 2005). Es decir, la activación del 5HT<sub>7</sub>-R induce un aumento en el largo de las neuritas sin afectar el número de éstas. Sin embargo, en estos estudios no se demostró si la activación del receptor cambia la polaridad neuronal y la definición axonal ni menos si se asocian a vías transduccionales que regulan el citoesqueleto.

Se ha descrito en cultivos hipocampales de ratón (P1-P2) en un estado mayor de madurez (10-12 DIV), que la activación del 5HT<sub>7</sub>-R durante 96 horas incrementa el número de protrusiones dendríticas y aumenta el número de las sinapsis excitatorias (Kobe y cols., 2012). En este mismo estudio, utilizando cultivos organotípicos hipocampales obtenidos de animales P6 y mantenidos durante 5-6 DIV, se observó que la estimulación por 96 horas del 5HT<sub>7</sub>-R promueve un incremento de la espinogénesis, aunque en resultados no mostrados los autores indican que no se afecta ni el tamaño ni la forma de la espina (Kobe y cols., 2012). Interesantemente, estos resultados no fueron reproducidos en estadios del desarrollo mas tardíos (21 DIV) (Kobe y cols., 2012), lo que puede explicarse quizás por una

reducción en la expresión del receptor en periodos de mayor desarrollo neuronal. Hay que destacar que los efectos de los agonistas anteriormente descritos han sido obtenidos mediante cultivos neuronales provenientes de animales en estado embrionario o posnatales (P1-P2), cultivos que pueden diferir entre ellos en el grado de compromiso de diferenciación y por tanto los efectos en estos modelos no necesariamente pueden ser reproducibles.

En esta Tesis, la estimulación con 8OH-DPAT durante 24 horas a los 2 DIV produce un aumento significativo en el número de las neuritas primarias  $< 40 \mu\text{m}$ , acompañado de un aumento en el largo neurítico total; efectos que no son prevenidos por el WAY-100635 ni por el SB269970. Estos resultados pueden explicarse como que el 8OH-DPAT activa a algún receptor que incrementa el número de neuritas cortas sin afectar su crecimiento. Interesantemente, se observó que la estimulación con 8OH-DPAT es capaz de promover una disminución significativa en la fosforilación inactivante de la cofilina en Ser<sup>3</sup>; efecto que a su vez fue insensible a la acción de los antagonistas WAY-100635 y SB269970. Sería importante a futuro el poder identificar el receptor activado por 8OH-DPAT y si el incremento en el número de neuritas se asocian o no a cambios en los niveles de cofilina-p. Adicionalmente se ha reportado que proteínas pertenecientes a la familia de las LIMK regulan la polimerización de la actina mediante la fosforilación de la cofilina en Ser<sup>3</sup> (Arber y cols., 1998). Más aún, la cofilina en su estado desfosforilado promueve el “severing” de los filamentos de actina lo que podría ejercer diferentes efectos sobre la morfología neuronal. Es decir, el aumento en la actividad de la cofilina podría conducir a la formación de nuevos puntos de nucleación que podrían dar cuenta del aumento en el número de neuritas observado.

Por otro lado, recientemente y utilizando cultivo primario de hipocampo de ratón (4-5 DIV) se describió que la estimulación durante 1 min con 5-HT 30 nM promueve una disminución en la F-actina en el cono de crecimiento dendrítico; efecto imitado por 8OH-DPAT 30 nM y no antagonizado significativamente por WAY-100635 30 nM (Ferreira y cols., 2010); sugiriendo que en este cultivo también se observan efectos del 8OH-DPAT insensibles a

antagonistas del 5HT<sub>1A</sub>-R. En este mismo estudio se utilizaron cultivos provenientes de animales knock-out para el 5HT<sub>1A</sub>-R, y se demostró que la estimulación con 5-HT 30 nM no produjo cambios en los conos de crecimiento dendrítico observados por la tinción con faloidina-rodamina la cual se circunscribe a la F-actina. Los autores concluyen que el 5HT<sub>1A</sub>-R regularía la dinámica de la actina restringiendo el crecimiento dendrítico y de esta forma modulando la conectividad neuronal durante un período del desarrollo (Ferreira y cols., 2010). Estos mismos autores determinaron que la 5-HT promueve una reducción en la actina filamentosa acompañado del incremento de la actina globular solo en ratones WT y no en ratones KO del 5HT<sub>1A</sub>-R; atribuyendo los efectos a la activación del 5HT<sub>1A</sub>-R.

En esta Tesis se demostró que la estimulación a los 2 DIV durante 24 h con 5-HT 100 nM no modifica el número, ni en el largo total de neuritas primarias y secundarias. Sin embargo, de acuerdo al uso de antagonistas demostramos que el receptor 5HT<sub>7</sub>-R como 5HT<sub>1A</sub>-R induce el crecimiento de las neuritas secundarias cortas (< 20 μm). Interesantemente, en esta Tesis observamos que a los 2 DIV el aumento en la Akt-p mediante el estímulo con 8OH-DPAT, fue prevenido por los antagonistas serotoninérgicos WAY-100635 y SB269970, involucrando a ambos 5HT<sub>1A</sub>-R y 5HT<sub>7</sub>-R en este efecto.

Los resultados observados tanto a nivel de la morfología y la vía de la Akt, sugieren que a este estadio temprano del desarrollo neuronal, ambos receptores pueden participar conjuntamente o cumplen funciones similares en la neurona. Otra explicación, es que a este estadio los antagonistas utilizados, no son suficientemente específicos por sus receptores.

En relación a nuestros hallazgos, se ha descrito en cultivos hipocampales de ratón P1-P2 mantenidos durante 4 h para su estabilización y posteriormente tratadas por 20 h con 5-HT 1 μM, produce un aumento en el largo total de neuritas; efecto antagonizado por el SB269970 demostrando la participación del 5HT<sub>7</sub>-R (Kvachnina y cols., 2005). Aunque este efecto pudiese ser semejante a lo observado en esta Tesis, hay que destacar que la intervención se hizo a un estadio muy temprano en el cultivo, donde aún no ha ocurrido la polaridad neuronal, ni tampoco se evaluó diferencias entre neuritas primarias y secundarias.

En esta Tesis demostramos a los 2 DIV que la adición de 5-HT durante 24 h *per se* no evoca ningún efecto sobre las neuritas primarias siendo posiblemente al activar distintos receptores con efectos opuestos. Esta proposición es avalada por el hecho de que al bloquear los 5HT<sub>7</sub>-R se observa un aumento en el número de neuritas primarias <40 μm y, en forma concordante se incrementa también el largo neurítico total de éstas. Estos resultados indicarían que probablemente la 5-HT regula el número de neuritas primarias cortas (<40 μm) a través de varios receptores con efectos opuestos; siendo uno de ellos el 5HT<sub>7</sub>-R, el cual disminuiría el número de neuritas primarias. Más aún, mediante la evaluación de cascadas transduccionales demostramos que al menos el 5HT<sub>7</sub>-R está acoplado a la activación de la Akt a los 2 DIV. De acuerdo a los resultados obtenidos a este estadio neuronal, el 5HT<sub>7</sub>-R participa regulando la actividad de la Akt y reduce la formación de neuritas primarias cortas pero estimula el crecimiento de las neuritas secundarias cortas.

En esta Tesis se determinó si estos efectos eran observables a estadios de mayor madurez del cultivo. Utilizando la 5-HT como agonista por 24 horas a los 7 DIV, se determinó mediante el análisis de Sholl una disminución significativa de la complejidad dendrítica observada entre las 40 a 90 μm, lo cual puede interpretarse como una disminución del crecimiento dendrítico y/o arborización. El aumento en las dendritas primarias < 40 μm ocurre a expensas de una disminución de las dendritas primarias y secundarias largas, lo que sugiere que la serotonina de alguna manera impide el crecimiento dendrítico y que de acuerdo a la disección farmacológica se asocia a la activación del receptor 5HT<sub>1A</sub>-R. Estudios en células Neuro2A transfectadas con el 5HT<sub>1A</sub>-R y células SK-N-SH que expresan endógenamente el 5HT<sub>1A</sub>-R, muestran que la estimulación con 8OH-DPAT 1 μM durante 16 horas aumenta el porcentaje de células con neuritas; efecto antagonizado por WAY-100169 10 μM. Más aún, este efecto fue parcialmente prevenido por el PD98059 y el LY294002, inhibidores de la MEK1 y PI3K respectivamente (Fricker y cols., 2005). Estudios con SiRNA para RAP1 sugieren un rol positivo para esta proteína en el crecimiento neurítico inducido por el 5HT<sub>1A</sub>-R y se ha sugerido que éste transduciría a través del Rap/Src/STAT3 (Fricker y cols., 2005) y puesto que el efecto sobre la morfología

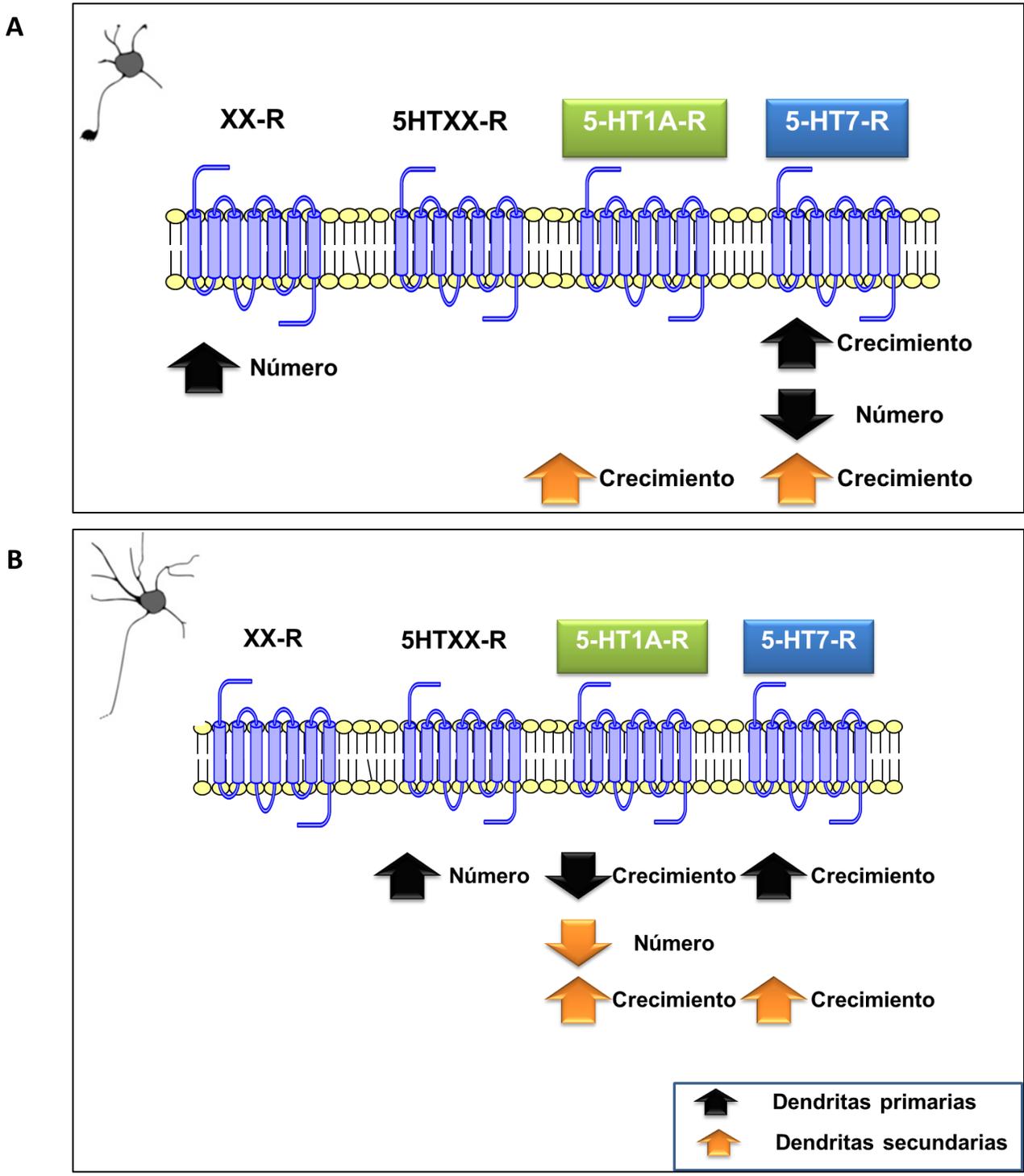
es sensible a toxina pertussis involucra además la participación de un G $\alpha$ i. (Errico y cols., 2001).

En esta Tesis, se determinó que el 5HT<sub>1A</sub>-R se encuentra localizado fundamentalmente a nivel del soma neuronal; sin embargo no se puede asegurar, por la limitación de la técnica, de que estos receptores estén ausentes en las dendritas. En el cerebro de ratas adultas el 5HT<sub>1A</sub>-R está expresado fundamentalmente en el compartimento somato-dendrítico de las neuronas piramidales CA1 del hipocampo y por tanto su ubicación podría determinar su función y/o acoplamiento a ciertas cascadas transduccionales (Chalmers y cols., 1991).

Nuestros resultados están de acuerdo con los recientemente descritos por el grupo de Ferreira, que ha sugerido que el 5HT<sub>1A</sub>-R restringiría el crecimiento dendrítico en las neuronas hipocampales. Estos investigadores hicieron un bloqueo farmacológico crónico *in vivo* del 5HT<sub>1A</sub>-R mediante el uso de WAY-100635 durante las 3-5 semanas de desarrollo posnatal; justamente período en el cual se ha descrito que disminuyen los niveles del RNAm para el 5HT<sub>7</sub>-R (Kobe y cols., 2012). Más aún, estos autores determinaron en estos animales, que presentan actividad reducida del 5HT<sub>1A</sub>-R, un aumento significativo en los puntos de ramificación en las neuronas en la porción del árbol dendrítico apical, no observándose diferencias en las dendritas más distales y basales (Ferreira y cols., 2010). Estos cambios concuerdan con resultados obtenidos en animales knock-out en los cuales se indica que la actividad del 5HT<sub>1A</sub>-R durante la 3-5 semanas posnatal es necesaria para restringir el crecimiento dendrítico apical. En el estudio de Ferreira se utilizó como estímulo 5-HT 30 nM de los 4 al 7 DIV en neuronas hipocampales lo cual produjo una disminución selectiva en los puntos de ramificación correspondientes a las dendritas terciarias. Estos resultados, difieren de los nuestros especialmente en los efectos de los puntos de ramificación; parámetro que no fue modificado por la presencia de 5-HT o 8OH-DPAT. Estas diferencias se pueden deber a los modelos celulares utilizados (ratas v/s ratón) y en la duración de los estímulos realizados. También en el estudio de Ferreira no se utilizó ninguna herramienta farmacológica para identificar los receptores serotoninérgicos involucrados.

Los resultados en esta Tesis sugieren que los efectos observados con 8OH-DPAT son más complejos de interpretar posiblemente por el hecho de que este fármaco es capaz de unirse a diferentes tipos de receptores y muchos de los efectos sobre la morfología son prevenidos tanto por el WAY-100635 como por el SB269970. Más aún, el 8OH-DPAT promueve el crecimiento de dendritas secundarias más largas ( $> 20 \mu\text{m}$ ) a los 8 DIV, efecto asociado a ambos receptores. Por otra parte demostramos en cultivos de 2 DIV la estimulación del 5HT<sub>7</sub>-R inhibe la formación de neuritas primarias pero estimula el crecimiento de las secundarias. Esto plantea posiblemente un efecto diferencial del receptor lo que podría asociarse a su localización. De hecho en esta Tesis el 5HT<sub>7</sub>-R se localiza tanto en el soma como en las neuritas. Debido a que este efecto no se observa a los 8 DIV se plantea que este receptor podría asumir otra función en neuronas más maduras. Por otro lado en neuronas más maduras, la activación del 5HT<sub>1A</sub>-R inhibe el crecimiento dendrítico y la complejidad dendrítica, probablemente al frenar el crecimiento o elongación, quedando por establecer los mecanismos asociados. Los cambios morfológicos asociados a los receptores 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>7</sub> se resumen en la Figura 50.

En resumen, este es el primer trabajo en el que se determina la relación de la serotonina mediante sus receptores 5HT<sub>1A</sub>-R y 5HT<sub>7</sub>-R con cambios en la morfología de neuronas hipocampales de ratas E18, con diferentes estadios del desarrollo neuronal. Por otra parte, este estudio refuerza la idea de que los agonistas serotoninérgicos disponibles ejercen acciones posiblemente a través de la activación de otros receptores, produciendo una gran confusión en la literatura. Además, esta Tesis destaca que los hallazgos realizados en líneas celulares no son extrapolables a lo que sucede en neuronas.



**Figura 50. Resumen de los cambios morfológicos en neuritas y dendritas asociados a los receptores 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>7</sub>.** A) cambios producidos por los agonistas serotoninérgicos sobre la morfología de neuritas a los 3 DIV. B) cambios producidos por los agonistas serotoninérgicos sobre la morfología dendrítica a los 8 DIV.

## 6.9. Modelo hipotético de los cambios morfológicos inducidos por la activación de receptores serotoninérgicos

En la regulación de la morfología neuronal, observada durante el desarrollo y durante cambios neuroplásticos, participan tanto factores extrínsecos como intrínsecos (Goldberg 2004). Los factores extrínsecos más relevantes corresponden a moléculas de la matriz extracelular y los factores tróficos que, mediante la regulación de vías transduccionales, producen cambios dinámicos en el citoesqueleto neuronal (Goldberg 2004). Es así, que se ha descrito que neurotrofinas como BDNF activan a la PI3K y MAPK, vías involucradas en la regulación de microtúbulos; donde la inhibición farmacológica de estas quinasas suprime la formación de neuritas inducida por BDNF (Dijkhuizen y cols., 2005) (Figura 51).

De acuerdo a los hallazgos en esta Tesis, se concluye que en ambos estadios neuronales, el 5HT<sub>7</sub>-R promueve el crecimiento de neuritas y dendritas, sugiriendo una participación sobre un aumento de la complejidad neuronal. El efecto observado a los 3 DIV puede estar mediado a través de la participación de la vía PI3K-Akt-GSK-3 $\beta$ ; cascada importante en la regulación del citoesqueleto de microtúbulos. La inactivación de la GSK-3 $\beta$  permite que proteínas asociada a microtúbulos (CRMP2, Tau y MAP2, entre otras promuevan la polimerización y su estabilización (Yoshimura y cols., 2006).

Adicionalmente la activación de la PI3K ha sido relacionada con la dinámica del citoesqueleto de actina, a través de la regulación de la familia Rho GTPasas. Estas proteínas tienen un papel central en mediar el crecimiento dendrítico (Gonzalez-Billault y cols., 2012). Las Rho GTPasas (Rho, Rac y Cdc42) son activadas por factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs) que facilitan el intercambio entre GDP y GTP y por tanto incrementan la actividad de las GTPasas (Kjoller y cols., 1999). La actividad de diversas GEFs puede ser modulada por la PI3K, proporcionando una conexión entre la vía de la PI3K y la formación de dendritas a través de las Rho GTPasas (Han y cols., 1998; Nimnual y cols., 1998; Rodgers y cols., 2002). Como se observa en la Figura 51, las proteínas ROCK y PAK son quinasas efectoras de las Rho GTPasas y regulan la actividad de la LIMK

(Edwards y cols., 1999;Maekawa y cols., 1999;Dan y cols., 2001), la que a su vez inactiva a la cofilina a través de su fosforilación (Arber y cols., 1998;Yang y cols., 1998). La cofilina en estado desfosforilado depolimeriza a la actina, por lo tanto juega un rol sustancial en la regulación de la dinámica de actina (Meberg y cols., 1998), regulando los niveles de la actina filamentosa y la actina globular (Figura 51).

Más aún, existen antecedentes que involucran la participación de la PKA como un regulador negativo de la actividad de la Rho (Jeon y cols., 2012). En el trabajo de Jeon y cols., en el año 2012, se muestra que el incremento de AMPc ejerce una inhibición de la actividad de Rho probablemente asociada a la activación de la PKA lo que produce un incremento en la extensión de neuritas en células PC12 (Jeon y cols., 2012).

Es importante considerar que distintas señales pueden converger en una vía de señalización clave para regular la morfología neuronal. Es así, que ambos receptores promueven un aumento de la actividad de la AC con el consecuente aumento de los niveles de AMPc y actividad de la PKA (Albert y cols., 1999; Bard y cols., 1993; Lin y cols., 2003); siendo factible que estos receptores inhiban a Rho lo cual podría explicar el crecimiento de las secundarias. Alternativamente estos receptores también podrían mediar una regulación sobre Cdc42 y Rac; proteínas reguladoras del crecimiento dendrítico. En apoyo a esto, en líneas celulares de fibroblasto NIH-3T3 transfectadas con el 5HT<sub>7</sub>-R, la adición de 5-HT produce un aumento de la actividad de la RhoA y de la Cdc42 (Kvachnina y cols., 2005); efectos asociados a un aumento en la actividad de Gα<sub>12</sub> (Figura 51). Por otro lado, en esta Tesis se demostró que ambos receptores promueven la activación de la vía Akt-GSK-3β; vía asociada a la regulación del citoesqueleto de microtúbulos (Figura 51).

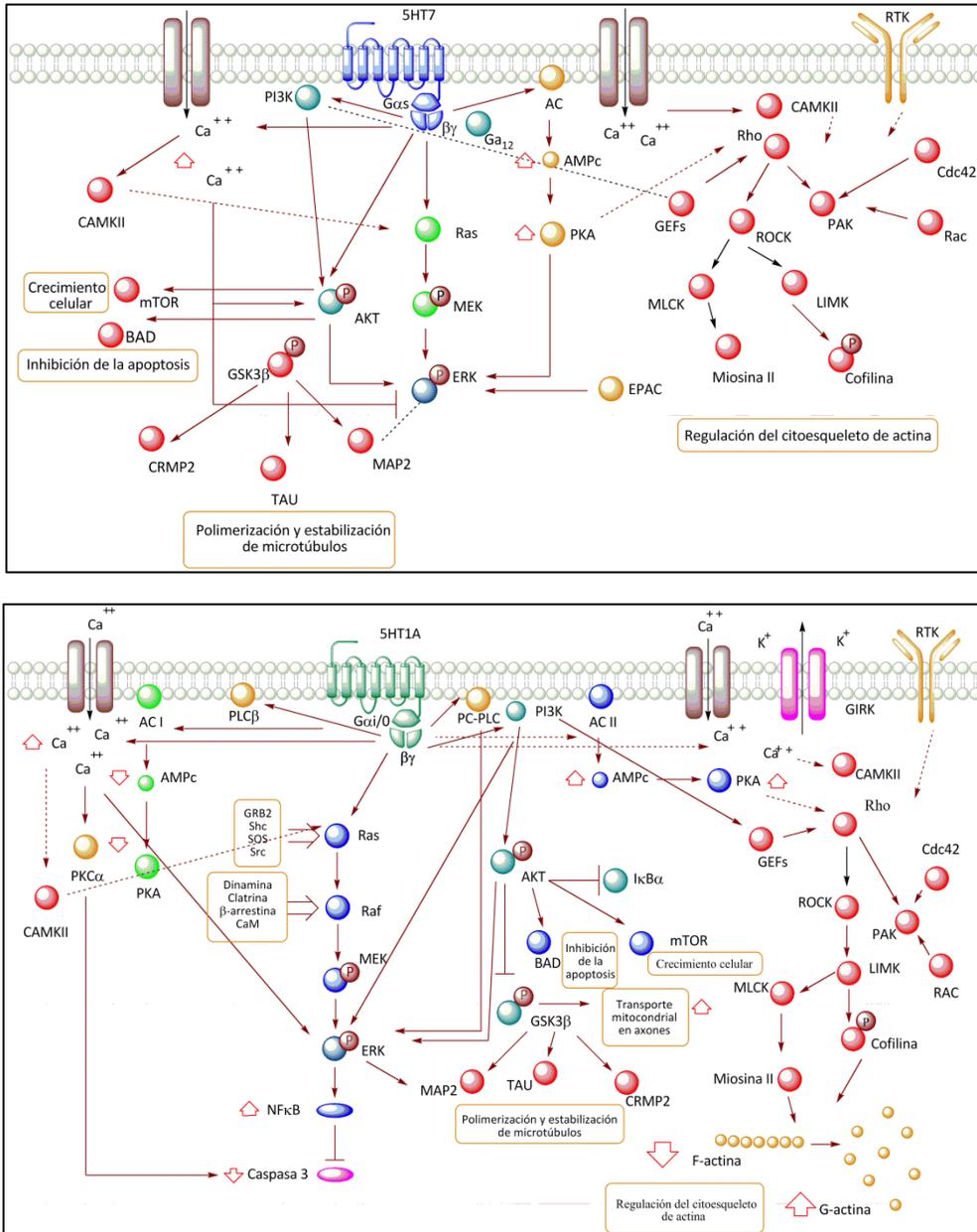
En esta Tesis, observamos que el 5HT<sub>1A</sub>-R a los 8 DIV, disminuye la complejidad dendrítica a través de una disminución del crecimiento de las dendritas primarias y número de dendritas secundarias. En estudios realizados en líneas celulares, se ha demostrado que tanto la activación del 5HT<sub>1A</sub>-R y 5HT<sub>7</sub>-R promueve un aumento de los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular (Adayev y col., 1999; Johnson-Farley y cols., 2005) (Figura 51). El aumento de

Ca<sup>2+</sup>, ha sido relacionado con la activación de la CaMKII y Ras; proteínas asociadas a la regulación del citoesqueleto de microtúbulos (Redmond y cols., 2005). Interesantemente, la CaMKII induce la activación RhoA y Cdc42 en cortes de tejido de hipocampo (Murakoshi y cols., 2011).

Ferreira y cols., en el año 2010, demostró que la 5-HT promueve una reducción en la actina filamentosa acompañado del incremento de la actina globular solo en ratones wt y no en ratones KO del 5HT<sub>1A</sub>-R. Por otro lado, en cultivo primario de hipocampo de ratón (4-5 DIV) se describió que la estimulación con 5-HT promueve una disminución en la F-actina en el cono de crecimiento dendrítico, siendo factible la idea de una regulación del citoesqueleto neuronal mediante el 5HT<sub>1A</sub>-R.

En resumen, los cambios observados sobre la morfología dendrítica, puede ser el resultado de la activación, en un espacio temporal, de distintas cascadas que controlan el citoesqueleto neuronal involucrando la participación de variaciones de Ca<sup>+2</sup> citosólico y vías como Ras-MEK-ERK, PI3K-Akt-GSK-3 $\beta$ , Rho-LIMK-cofilina y Rho-LIMK-MLCK, entre otras (Figura 51).

Probablemente, el “pool” de actina y microtúbulos presente en las neuronas son regulados a través de la acción de diferentes vías y en distinta temporalidad. En nuestro estudio, se realizaron homogenizados totales de hipocampo y en relación a las vías estudiadas puede que no se reflejen los efectos locales que ocurren específicamente en las dendritas. Probablemente, mediante técnicas inmunocitoquímicas se pueda determinar los efectos locales producidos en las dendritas.



**Figura 51. Modelo hipotético de la activación de los receptores 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>7</sub> y vías que controlan el citoesqueleto neuronal.** En la figura se destacan las vías asociadas tras la activación de los receptores descritas en modelos neuronales y no neuronales. Es importante señalar que muchas de estas vías pueden ser activadas por receptores de neurotrofinas (RTK). Se destaca en círculos rojos vías putativas que pueden ser moduladas por los receptores 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>7</sub>. Estos receptores activan a la Akt y ERK, vías que controlan el citoesqueleto de microtúbulos a través de la fosforilación que proteínas asociadas a microtúbulos como MAP2, TAU y CRMP2. El aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular eventualmente gatillaría la activación de proteínas como CAMKII, Ras, Cdc42 y Rho. De esta forma se podría controlar el citoesqueleto de microtúbulos y de actina mediante la activación Ras-Raf-MEK-ERK y efectores de las RhoGTPasas que controlan la dinámica de actina como ROCK-PAK-LIMK-cofilina-MLCK. Adicionalmente, la activación de la PI3K y el aumento de los niveles de AMPc y activación de la PKA, pueden ejercer un control sobre la actividad de la Rho. Adicionalmente, la actividad de diversas GEFs puede ser modulada por la PI3K, proporcionando una conexión entre la vía de la PI3K y Rho GTPasas.

## 7. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Hay que considerar que en esta Tesis los cambios en las cascadas transduccionales son observados durante estimulaciones agudas (minutos-hora) y no sabemos si los cambios morfológicos responden a una activación aguda o cíclica durante las 24 h de estimulación con los agonistas. Por otra parte, no se midió la estabilidad de los fármacos durante las 24 horas que duró el estímulo para determinar cambios morfológicos.

Además, la evaluación de las proteínas de interés para esta Tesis se realizó en cultivos provenientes de hipocampo total el cual es heterogéneo compuesto de interneuronas y neuronas piramidales pudiendo plantearse que los efectos observados sean indirectos.

Por otra parte y de acuerdo a los resultados de inmunotinción, se detectó una homogeneidad en la expresión de los receptores 5HT<sub>1A</sub> y 5HT<sub>7</sub>. No obstante, no se realizaron estudio de doble marcaje de forma de poder determinar si en una misma neurona están presentes ambos receptores y con la misma distribución neuronal. Más aún, es difícil precisar si la contribución de un pool particular de receptores (somático/dendrítico) es el responsable de estos cambios. Más aún, no se determinaron posibles vías que den cuenta de los cambios morfológicos en asociación a la activación de receptores serotoninérgicos.

Finalmente, aunque los procesos de desensibilización y regulación hacia abajo de los receptores acoplados a proteína G es muy frecuente, no existe evidencia de estos fenómenos en cultivos neuronales. No obstante se ha descrito *in vivo* que la activación con agonistas del 5HT<sub>7</sub>-R en forma prolongada induce la *down regulation* en el hipotálamo tras la administración por 21 días de un inhibidor del transportador de serotonina (Sleight y cols., 1995).

## 8. CONCLUSIONES

Durante la madurez del cultivo se observa una polarización del 5HT<sub>1A</sub>-R desde el soma hacia las dendritas.

En cultivos primarios hipocampales de rata, los niveles de las isoformas 5HT<sub>7a</sub>-R y 5HT<sub>7b</sub>-R no varían una con respecto de la otra durante los días del cultivo 2-14 DIV. No obstante, ambas isoformas aumentan significativamente entre los 2 y 14 DIV y presentan una distribución somato-dendrítica.

El 5HT<sub>7</sub>-R y el 5HT<sub>1A</sub>-R activan a la vía Akt- GSK-3 $\beta$  en cultivos hipocampales de 2 DIV.

El estímulo con 8OH-DPAT sobre neuronas con 7 DIV, promueve un aumento de la Akt-p, efecto que no se previene por la adición de los antagonistas de los 5HT<sub>1A</sub>-R y 5HT<sub>7</sub>-R, sugiriendo la participación otro receptor. Interesantemente, a este estadio neuronal se produce un desacoplamiento de la vía Akt- GSK-3 $\beta$ .

Agonistas serotoninérgicos aumentan la actividad de la cofilina al disminuir su estado de fosforilación independientemente del estado de madurez de las neuronas; efecto que no está mediado por los 5HT<sub>1A</sub>-R y 5HT<sub>7</sub>-R.

En cultivos de 2 DIV la estimulación del 5HT<sub>7</sub>-R inhibe la formación de neuritas primarias pero estimula el crecimiento de las secundarias.

Los cambios inducidos por 5-HT a los 8 DIV, sugieren que el 5HT<sub>1A</sub>-R contribuye en la disminución del número y largo de las dendritas primarias y secundarias más largas. Es decir, el 5HT<sub>1A</sub>-R inhibe el crecimiento dendrítico y la complejidad dendrítica, probablemente al frenar el crecimiento o elongación, quedando por establecer los mecanismos asociados.

## 9. PROYECCIONES DEL ESTUDIO

A futuro sería de gran importancia evaluar los efectos de la serotonina sobre la morfología dendrítica y su relación con las cascadas transduccionales mediante la utilización de inhibidores farmacológicos de las vías transduccionales PI3K-Akt-GSK3 $\beta$ , MEK y Rho-LIMK-Cofilina. De esta forma se debe determinar si los cambios observados en esta Tesis en el número y largo dendrítico, promovidos por la activación de los receptores 5HT<sub>1A</sub>-R y 5HT<sub>7</sub>-R, se previenen por la inhibición de las vías antes mencionadas.

Los efectos observados en la estimulación con los agonistas serotoninérgicos sobre las vías estudiadas y no asociados a los receptores 5HT<sub>1A</sub>-R y 5HT<sub>7</sub>-R, se pueden deber a la participación de otros receptores serotoninérgicos, por lo que el estudio con agonistas y antagonistas específicos para estos receptores contribuiría a dilucidar el rol de la serotonina sobre estas cascadas transduccionales.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Adayev, T. y cols (1999). "Agonist stimulation of the serotonin<sub>1A</sub> receptor causes suppression of anoxia-induced apoptosis via mitogen-activated protein kinase in neuronal HN2-5 cells." J Neurochem **72**(4): 1489-1496.
- Adayev, T. y cols (2003). "The G protein-coupled 5-HT<sub>1A</sub> receptor causes suppression of caspase-3 through MAPK and protein kinase Calpha." Biochim Biophys Acta **1640**(1): 85-96.
- Albert, P. R. y cols (1999). "Constitutive G(i<sub>2</sub>)-dependent activation of adenylyl cyclase type II by the 5-HT<sub>1A</sub> receptor. Inhibition by anxiolytic partial agonists." J Biol Chem **274**(50): 35469-35474.
- Albert, P. R. y cols (2001). "Receptor signaling and structure: insights from serotonin-1 receptors." Trends Endocrinol Metab **12**(10): 453-460.
- Arber, S. y cols (1998). "Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase." Nature **393**(6687): 805-809.
- Assie, M. B. y cols (2000). "[<sup>3</sup>H]-8-OH-DPAT binding in the rat brain raphe area: involvement of 5-HT<sub>1A</sub> and non-5-HT<sub>1A</sub> receptors." Br J Pharmacol **130**(6): 1348-1352.
- Azmitia, E. C. (2001). "Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis." Brain Res Bull **56**(5): 413-424.
- Azmitia, E. C. y cols (1992). "5-HT<sub>1A</sub> and serotonin: a possible astrocytic-neuronal link to neuropathology of Alzheimer's disease." Prog Brain Res **94**: 459-473.
- Azmitia, E. C. y cols (1995). "5-HT<sub>1A</sub> agonist and dexamethasone reversal of para-chloroamphetamine induced loss of MAP-2 and synaptophysin immunoreactivity in adult rat brain." Brain Res **677**(2): 181-192.
- Aznar, S. y cols (2003). "The 5-HT<sub>1A</sub> serotonin receptor is located on calbindin- and parvalbumin-containing neurons in the rat brain." Brain Res **959**(1): 58-67.
- Bacon, W. L. y cols (2000). "5-Hydroxytryptamine(7) receptor activation decreases slow afterhyperpolarization amplitude in CA3 hippocampal pyramidal cells." J Pharmacol Exp Ther **294**(2): 672-679.
- Baker, L. P. y cols (1999). "Regulation and immunohistochemical localization of betagamma-stimulated adenylyl cyclases in mouse hippocampus." J Neurosci **19**(1): 180-192.
- Bard, J. A. y cols (1993). "Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT<sub>7</sub>) positively linked to adenylyl cyclase." J Biol Chem **268**(31): 23422-23426.
- Bockaert, J. y cols (2008). "5-HT<sub>4</sub> receptors: history, molecular pharmacology and brain functions." Neuropharmacology **55**(6): 922-931.
- Boess, F. G. y cols (1995). "Ultrastructure of the 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptor." J Neurochem **64**(3): 1401-1405.
- Bonaventure, P. y cols (2002). "Reconsideration of 5-hydroxytryptamine (5-HT)<sub>7</sub> receptor distribution using [<sup>3</sup>H]5-carboxamidotryptamine and [<sup>3</sup>H]8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetraline: analysis in brain of 5-HT<sub>1A</sub> knockout and 5-HT<sub>1A/1B</sub> double-knockout mice." J Pharmacol Exp Ther **302**(1): 240-248.

Bonnin, A. y cols (2011). "A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain." Nature **472**(7343): 347-350.

Bonnin, A. y cols (2006). "Expression mapping of 5-HT1 serotonin receptor subtypes during fetal and early postnatal mouse forebrain development." Neuroscience **141**(2): 781-794.

Brezun, J. M. y cols (1999). "Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats." Neuroscience **89**(4): 999-1002.

Buhl, A. M. y cols (1995). "G alpha 12 and G alpha 13 stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly." J Biol Chem **270**(42): 24631-24634.

Buznikov, G. A. y cols (2001). "Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis." Cell Tissue Res **305**(2): 177-186.

Cadogan, A. K. y cols (1994). "Serotonin 5-HT1A receptor activation increases cyclic AMP formation in the rat hippocampus in vivo." J Neurochem **62**(5): 1816-1821.

Carrel, D. y cols (2008). "Targeting of the 5-HT1A serotonin receptor to neuronal dendrites is mediated by Yif1B." J Neurosci **28**(32): 8063-8073.

Cote, F. y cols (2007). "Maternal serotonin is crucial for murine embryonic development." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(1): 329-334.

Cowen, D. S. y cols (2005). "5-HT receptors couple to activation of Akt, but not extracellular-regulated kinase (ERK), in cultured hippocampal neurons." J Neurochem **93**(4): 910-917.

Cowen, D. S. y cols (1996). "Activation of a mitogen-activated protein kinase (ERK2) by the 5-hydroxytryptamine1A receptor is sensitive not only to inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase, but to an inhibitor of phosphatidylcholine hydrolysis." J Biol Chem **271**(37): 22297-22300.

Chalmers, D. T. y cols (1991). "Comparative anatomical distribution of 5-HT1A receptor mRNA and 5-HT1A binding in rat brain--a combined in situ hybridisation/in vitro receptor autoradiographic study." Brain Res **561**(1): 51-60.

Charnay, Y. y cols (2010). "Brain serotonergic circuitries." Dialogues Clin Neurosci **12**(4): 471-487.

Chen, L. y cols (1994). "PCPA reduces both monoaminergic afferents and nonmonoaminergic synapses in the cerebral cortex." Neurosci Res **19**(1): 111-115.

Chen, S. y cols (2007). "Serotonin stimulates mitochondrial transport in hippocampal neurons." Mol Cell Neurosci **36**(4): 472-483.

Chern, Y. y cols (1995). "Regulation of adenylyl cyclase type VI activity during desensitization of the A2a adenosine receptor-mediated cyclic AMP response: role for protein phosphatase 2A." Mol Pharmacol **48**(1): 1-8.

Dan, C. y cols (2001). "Cytoskeletal changes regulated by the PAK4 serine/threonine kinase are mediated by LIM kinase 1 and cofilin." J Biol Chem **276**(34): 32115-32121.

Daubert, E. A. y cols (2010). "Serotonin: a regulator of neuronal morphology and circuitry." Trends Neurosci **33**(9): 424-434.

Della Rocca, G. J. y cols (1999). "Serotonin 5-HT1A receptor-mediated Erk activation requires calcium/calmodulin-dependent receptor endocytosis." J Biol Chem **274**(8): 4749-4753.

Dijkhuizen, P. A. y cols (2005). "BDNF regulates primary dendrite formation in cortical neurons via the PI3-kinase and MAP kinase signaling pathways." J Neurobiol **62**(2): 278-288.

Dong, J. y cols (1998). "Full agonistic properties of BAY x 3702 on presynaptic and postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptors electrophysiological studies in the rat hippocampus and dorsal raphe." J Pharmacol Exp Ther **286**(3): 1239-1247.

Dutton, A. y cols (2008). 5-Hydroxytryptamine in the Central Nervous system. Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology. A. Lajthay. Berlin, Springer: 172-198.

Edwards, D. C. y cols (1999). "Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics." Nat Cell Biol **1**(5): 253-259.

Eldar-Finkelman, H. (2002). "Glycogen synthase kinase 3: an emerging therapeutic target." Trends Mol Med **8**(3): 126-132.

Errico, M. y cols (2001). "5-HT<sub>7</sub> receptors activate the mitogen activated protein kinase extracellular signal related kinase in cultured rat hippocampal neurons." Neuroscience **102**(2): 361-367.

Fargin, A. y cols (1989). "Effector coupling mechanisms of the cloned 5-HT<sub>1A</sub> receptor." J Biol Chem **264**(25): 14848-14852.

Federman, A. D. y cols (1992). "Hormonal stimulation of adenylyl cyclase through Gi-protein beta gamma subunits." Nature **356**(6365): 159-161.

Ferreira, T. A. y cols (2010). "Serotonin receptor 1A modulates actin dynamics and restricts dendritic growth in hippocampal neurons." Eur J Neurosci **32**(1): 18-26.

Fiedler, J. L. y cols (1994). "Regional alteration of cholinergic function in central neurons of trisomy 16 mouse fetuses, an animal model of human trisomy 21 (Down syndrome)." Brain Res **658**(1-2): 27-32.

Forster, E. A. y cols (1995). "A pharmacological profile of the selective silent 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist, WAY-100635." Eur J Pharmacol **281**(1): 81-88.

Frame, S. y cols (2001). "GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery." Biochem J **359**(Pt 1): 1-16.

Fricker, A. D. y cols (2005). "Serotonin receptor activation leads to neurite outgrowth and neuronal survival." Brain Res Mol Brain Res **138**(2): 228-235.

Garnovskaya, M. N. y cols (1998). "Rapid activation of sodium-proton exchange and extracellular signal-regulated protein kinase in fibroblasts by G protein-coupled 5-HT<sub>1A</sub> receptor involves distinct signalling cascades." Biochem J **330** ( Pt 1): 489-495.

Garnovskaya, M. N. y cols (1996). "Ras-dependent activation of fibroblast mitogen-activated protein kinase by 5-HT<sub>1A</sub> receptor via a G protein beta gamma-subunit-initiated pathway." Biochemistry **35**(43): 13716-13722.

Gaspar, P. y cols (2003). "The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics." Nat Rev Neurosci **4**(12): 1002-1012.

Goldberg, J. L. (2004). "Intrinsic neuronal regulation of axon and dendrite growth." Curr Opin Neurobiol **14**(5): 551-557.

Goldstein, R. y cols (1984). "Distribution of serotonin-immunoreactivity in juvenile *Aplysia*." Neuroscience **11**(2): 535-547.

Gonzalez-Billault, C. y cols (2012). "The role of small GTPases in neuronal morphogenesis and polarity." Cytoskeleton (Hoboken) **69**(7): 464-485.

Gonzalez-Burgos, I. y cols (1996). "Tryptophan restriction causes long-term plastic changes in corticofrontal pyramidal neurons." Int J Dev Neurosci **14**(5): 673-679.

Gould, E. (1999). "Serotonin and hippocampal neurogenesis." Neuropsychopharmacology **21**(2 Suppl): 46S-51S.

Govek, E. E. y cols (2005). "The role of the Rho GTPases in neuronal development." Genes Dev **19**(1): 1-49.

Grimes, C. A. y cols (2001). "The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling." Prog Neurobiol **65**(4): 391-426.

Gross, C. y cols (2002). "Serotonin1A receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult." Nature **416**(6879): 396-400.

Gutknecht, L. y cols (2012). "Impacts of Brain Serotonin Deficiency following Tph2 Inactivation on Development and Raphe Neuron Serotonergic Specification." PLoS One **7**(8): e43157.

Hagan, J. J. y cols (2000). "Characterization of SB-269970-A, a selective 5-HT(7) receptor antagonist." Br J Pharmacol **130**(3): 539-548.

Hall, A. (1998). "Rho GTPases and the actin cytoskeleton." Science **279**(5350): 509-514.

Han, J. y cols (1998). "Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav." Science **279**(5350): 558-560.

Haring, J. H. y cols (1999). "Dentate granule cell function after neonatal treatment with parachloroamphetamine or 5,7-dihydroxytryptamine." Brain Res Dev Brain Res **114**(2): 269-272.

Hayashi, T. y cols (2010). "Roles of serotonin 5-HT3 receptor in the formation of dendrites and axons in the rat cerebral cortex: an in vitro study." Neurosci Res **66**(1): 22-29.

Hedlund, P. B. (2009). "The 5-HT7 receptor and disorders of the nervous system: an overview." Psychopharmacology (Berl) **206**(3): 345-354.

Hedlund, P. B. y cols (2004). "Functional, molecular and pharmacological advances in 5-HT7 receptor research." Trends Pharmacol Sci **25**(9): 481-486.

Heidmann, D. E. y cols (1997). "Four 5-hydroxytryptamine7 (5-HT7) receptor isoforms in human and rat produced by alternative splicing: species differences due to altered intron-exon organization." J Neurochem **68**(4): 1372-1381.

Hensler, J. G. y cols (1996). "Expression and modulation of 5-hydroxytryptamine1A receptors in P11 cells." J Pharmacol Exp Ther **278**(3): 1138-1145.

Herlenius, E. y cols (2004). "Development of neurotransmitter systems during critical periods." Exp Neurol **190** Suppl 1: S8-21.

Hillion, J. y cols (1993). "Prenatal developmental expression of rat brain 5-HT1A receptor gene followed by PCR." Biochem Biophys Res Commun **191**(3): 991-997.

Hornung, J. P. (2003). "The human raphe nuclei and the serotonergic system." J Chem Neuroanat **26**(4): 331-343.

Hsiung, S. C. y cols (2005). "Roles of extracellular signal-regulated kinase and Akt signaling in coordinating nuclear transcription factor-kappaB-dependent cell survival after serotonin 1A receptor activation." J Neurochem **95**(6): 1653-1666.

Hur, E. M. y cols (2010). "GSK3 signalling in neural development." Nat Rev Neurosci **11**(8): 539-551.

Jacobs, B. L. y cols (1992). "Structure and function of the brain serotonin system." Physiol Rev **72**(1): 165-229.

Jasper, J. R. y cols (1997). "Cloning, expression and pharmacology of a truncated splice variant of the human 5-HT7 receptor (h5-HT7b)." Br J Pharmacol **122**(1): 126-132.

Jeon, C. Y. y cols (2012). "Control of neurite outgrowth by RhoA inactivation." J Neurochem **120**(5): 684-698.

Jiang, H. y cols (2005). "Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: critical roles of GSK-3beta and its upstream regulators." Cell **120**(1): 123-135.

Johnson-Farley, N. N. y cols (2005). "Enhanced activation of Akt and extracellular-regulated kinase pathways by simultaneous occupancy of Gq-coupled 5-HT2A receptors and Gs-coupled 5-HT7A receptors in PC12 cells." J Neurochem **92**(1): 72-82.

Katoh, H. y cols (1998). "Constitutively active Galpha12, Galpha13, and Galphaq induce Rho-dependent neurite retraction through different signaling pathways." J Biol Chem **273**(44): 28700-28707.

Kessels, M. M. y cols (2011). "Controlling actin cytoskeletal organization and dynamics during neuronal morphogenesis." Eur J Cell Biol **90**(11): 926-933.

Kjoller, L. y cols (1999). "Signaling to Rho GTPases." Exp Cell Res **253**(1): 166-179.

Kobe, F. y cols (2012). "5-HT7R/G12 signaling regulates neuronal morphology and function in an age-dependent manner." J Neurosci **32**(9): 2915-2930.

Kumar, V. y cols (2005). "Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways." J Neurosci **25**(49): 11288-11299.

Kvachnina, E. y cols (2005). "5-HT7 receptor is coupled to G alpha subunits of heterotrimeric G12-protein to regulate gene transcription and neuronal morphology." J Neurosci **25**(34): 7821-7830.

Langhammer, C. G. y cols (2010). "Automated Sholl analysis of digitized neuronal morphology at multiple scales: Whole cell Sholl analysis versus Sholl analysis of arbor subregions." Cytometry A **77**(12): 1160-1168.

Lauder, J. M. (1993). "Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers." Trends Neurosci **16**(6): 233-240.

Li, X. y cols (2004). "In vivo regulation of glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta) by serotonergic activity in mouse brain." Neuropsychopharmacology **29**(8): 1426-1431.

Lidov, H. G. y cols (1982). "An immunohistochemical study of serotonin neuron development in the rat: ascending pathways and terminal fields." Brain Res Bull **8**(4): 389-430.

Lin, S. L. y cols (2003). "Coupling of neuronal 5-HT7 receptors to activation of extracellular-regulated kinase through a protein kinase A-independent pathway that can utilize Epac." J Neurochem **87**(5): 1076-1085.

Liu, Y. F. y cols (1999). "Stimulation of cAMP synthesis by Gi-coupled receptors upon ablation of distinct Galphai protein expression. Gi subtype specificity of the 5-HT1A receptor." J Biol Chem **274**(23): 16444-16450.

MacLaurin, S. A. y cols (2007). "Hippocampal dendritic arbor growth in vitro: regulation by Reelin-Disabled-1 signaling." Brain Res **1172**: 1-9.

Maekawa, M. y cols (1999). "Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase." Science **285**(5429): 895-898.

Mannoury la Cour, C. y cols (2006). "Regional differences in the coupling of 5-hydroxytryptamine-1A receptors to G proteins in the rat brain." Mol Pharmacol **70**(3): 1013-1021.

Martin, K. F. y cols (1992). "Opposing roles for 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptors in the control of 5-HT release in rat hippocampus in vivo." Br J Pharmacol **106**(1): 139-142.

Martinowich, K. y cols (2008). "Interaction between BDNF and serotonin: role in mood disorders." Neuropsychopharmacology **33**(1): 73-83.

Matthys, A. y cols (2011). "Role of the 5-HT<sub>7</sub> receptor in the central nervous system: from current status to future perspectives." Mol Neurobiol **43**(3): 228-253.

Mattson, M. P. y cols (2004). "BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders." Trends Neurosci **27**(10): 589-594.

Meberg, P. J. y cols (1998). "Actin depolymerizing factor and cofilin phosphorylation dynamics: response to signals that regulate neurite extension." Cell Motil Cytoskeleton **39**(2): 172-190.

Millan, M. J. y cols (2008). "Signaling at G-protein-coupled serotonin receptors: recent advances and future research directions." Trends Pharmacol Sci **29**(9): 454-464.

Miquel, M. C. y cols (1994). "Postnatal development and localization of 5-HT<sub>1A</sub> receptor mRNA in rat forebrain and cerebellum." Brain Res Dev Brain Res **80**(1-2): 149-157.

Muneoka, K. T. y cols (2003). "5-Hydroxytryptamine<sub>7</sub> (5-HT<sub>7</sub>) receptor immunoreactivity-positive 'stigmoid body'-like structure in developing rat brains." Int J Dev Neurosci **21**(3): 133-143.

Murakoshi, H. y cols (2011). "Local, persistent activation of Rho GTPases during plasticity of single dendritic spines." Nature **472**(7341): 100-104.

Nakatani, Y. y cols (2008). "Augmented brain 5-HT crosses the blood-brain barrier through the 5-HT transporter in rat." Eur J Neurosci **27**(9): 2466-2472.

Nandam, L. S. y cols (2007). "5-HT<sub>7</sub>, neurogenesis and antidepressants: a promising therapeutic axis for treating depression." Clin Exp Pharmacol Physiol **34**(5-6): 546-551.

Naska, S. y cols (2006). "An essential role for the integrin-linked kinase-glycogen synthase kinase-3 beta pathway during dendrite initiation and growth." J Neurosci **26**(51): 13344-13356.

Nimnual, A. S. y cols (1998). "Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the Ras exchanger Sos." Science **279**(5350): 560-563.

Norum, J. H. y cols (2003). "Ras-dependent ERK activation by the human G(s)-coupled serotonin receptors 5-HT<sub>4</sub>(b) and 5-HT<sub>7</sub>(a)." J Biol Chem **278**(5): 3098-3104.

Papaioannou, A. y cols (2002). "Effects of neonatal handling on basal and stress-induced monoamine levels in the male and female rat brain." Neuroscience **114**(1): 195-206.

Patel, T. D. y cols (2005). "Ontogeny of 5-HT<sub>1A</sub> receptor expression in the developing hippocampus." Brain Res Dev Brain Res **157**(1): 42-57.

Persico, A. M. y cols (2006). "Multiple receptors mediate the trophic effects of serotonin on ventroposterior thalamic neurons in vitro." Brain Res **1095**(1): 17-25.

Polter, A. M. y cols (2010). "5-HT<sub>1A</sub> receptor-regulated signal transduction pathways in brain." Cell Signal **22**(10): 1406-1412.

Polter, A. M. y cols (2011). "Glycogen Synthase Kinase-3 is an Intermediate Modulator of Serotonin Neurotransmission." Front Mol Neurosci **4**: 31.

Polter, A. M. y cols (2012). "Functional significance of glycogen synthase kinase-3 regulation by serotonin." Cell Signal **24**(1): 265-271.

Redmond, L. y cols (2005). "Regulation of dendritic development by calcium signaling." Cell Calcium **37**(5): 411-416.

Riad, M. y cols (1994). "Neurotrophic effects of ipsapirone and other 5-HT1A receptor agonists on septal cholinergic neurons in culture." Brain Res Dev Brain Res **82**(1-2): 245-258.

Riad, M. y cols (2000). "Somatodendritic localization of 5-HT1A and preterminal axonal localization of 5-HT1B serotonin receptors in adult rat brain." J Comp Neurol **417**(2): 181-194.

Riad, M. y cols (2001). "Agonist-induced internalization of serotonin-1a receptors in the dorsal raphe nucleus (autoreceptors) but not hippocampus (heteroreceptors)." J Neurosci **21**(21): 8378-8386.

Rodgers, E. E. y cols (2002). "Functions of PI 3-kinase in development of the nervous system." Int J Dev Neurosci **20**(3-5): 187-197.

Ruat, M. y cols (1993). "Molecular cloning, characterization, and localization of a high-affinity serotonin receptor (5-HT7) activating cAMP formation." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(18): 8547-8551.

Saenz del Burgo, L. y cols (2008). "Distribution and neurochemical characterization of neurons expressing GIRK channels in the rat brain." J Comp Neurol **510**(6): 581-606.

Sapan, C. V. y cols (1999). "Colorimetric protein assay techniques." Biotechnol Appl Biochem **29** ( Pt 2): 99-108.

Semkova, I. y cols (1998). "Neuroprotective effect of 5-HT1A receptor agonist, Bay X 3702, demonstrated in vitro and in vivo." Eur J Pharmacol **359**(2-3): 251-260.

Serfaty, C. A. y cols (2008). "Nutritional tryptophan restriction and the role of serotonin in development and plasticity of central visual connections." Neuroimmunomodulation **15**(3): 170-175.

Shen, Y. y cols (1993). "Molecular cloning and expression of a 5-hydroxytryptamine7 serotonin receptor subtype." J Biol Chem **268**(24): 18200-18204.

Sholl, D. A. (1953). "Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat." J Anat **87**(4): 387-406.

Sleight, A. J. y cols (1995). "Identification of 5-hydroxytryptamine7 receptor binding sites in rat hypothalamus: sensitivity to chronic antidepressant treatment." Mol Pharmacol **47**(1): 99-103.

Sotelo, C. y cols (1990). "Direct Immunohistochemical Evidence of the Existence of 5-HT1A Autoreceptors on Serotonergic Neurons in the Midbrain Raphe Nuclei." Eur J Neurosci **2**(12): 1144-1154.

Strathmann, M. P. y cols (1991). "G alpha 12 and G alpha 13 subunits define a fourth class of G protein alpha subunits." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(13): 5582-5586.

Tahirovic, S. y cols (2009). "Neuronal polarity." Cold Spring Harb Perspect Biol **1**(3): a001644.

Thomas, D. R. y cols (2002). "[3H]-SB-269970 radiolabels 5-HT7 receptors in rodent, pig and primate brain tissues." Neuropharmacology **42**(1): 74-81.

Turner, J. H. y cols (2004). "Calmodulin interacts with the third intracellular loop of the serotonin 5-hydroxytryptamine1A receptor at two distinct sites: putative role in receptor phosphorylation by protein kinase C." J Biol Chem **279**(17): 17027-17037.

Udo, H. y cols (2005). "Serotonin-induced regulation of the actin network for learning-related synaptic growth requires Cdc42, N-WASP, and PAK in Aplysia sensory neurons." Neuron **45**(6): 887-901.

Upton, A. L. y cols (2002). "Lack of 5-HT(1B) receptor and of serotonin transporter have different effects on the segregation of retinal axons in the lateral geniculate nucleus compared to the superior colliculus." Neuroscience **111**(3): 597-610.

van Kesteren, R. E. y cols (2003). "The role of neurotransmitters in neurite outgrowth and synapse formation." Rev Neurosci **14**(3): 217-231.

Vanhaesebroeck, B. y cols (2000). "The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB." Biochem J **346 Pt 3**: 561-576.

Varnas, K. y cols (2004). "Distribution of 5-HT7 receptors in the human brain: a preliminary autoradiographic study using [3H]SB-269970." Neurosci Lett **367**(3): 313-316.

Varrault, A. y cols (1991). "5-HT1A-sensitive adenylyl cyclase of rodent hippocampal neurons: effects of antidepressant treatments and chronic stimulation with agonists." J Pharmacol Exp Ther **257**(1): 433-438.

Vitalis, T. y cols (2007). "Embryonic depletion of serotonin affects cortical development." Eur J Neurosci **26**(2): 331-344.

Walther, D. J. y cols (2003). "A unique central tryptophan hydroxylase isoform." Biochem Pharmacol **66**(9): 1673-1680.

Wallace, J. A. y cols (1983). "Development of the serotonergic system in the rat embryo: an immunocytochemical study." Brain Res Bull **10**(4): 459-479.

Whitaker-Azmitia, P. M. (2005). "Behavioral and cellular consequences of increasing serotonergic activity during brain development: a role in autism?" Int J Dev Neurosci **23**(1): 75-83.

Whitaker-Azmitia, P. M. y cols (1995). "Serotonin depletion in the adult rat causes loss of the dendritic marker MAP-2. A new animal model of schizophrenia?" Neuropsychopharmacology **12**(3): 269-272.

Whitaker-Azmitia, P. M. y cols (1990). "Stimulation of astroglial 5-HT1A receptors releases the serotonergic growth factor, protein S-100, and alters astroglial morphology." Brain Res **528**(1): 155-158.

Wilson, C. C. y cols (1998). "Serotonin regulates synaptic connections in the dentate molecular layer of adult rats via 5-HT1a receptors: evidence for a glial mechanism." Brain Res **782**(1-2): 235-239.

Winter, C. y cols (2009). "Prenatal immune activation leads to multiple changes in basal neurotransmitter levels in the adult brain: implications for brain disorders of neurodevelopmental origin such as schizophrenia." Int J Neuropsychopharmacol **12**(4): 513-524.

Witte, H. y cols (2008). "Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization." J Cell Biol **180**(3): 619-632.

Wood, M. y cols (2000). "Antagonist activity of meta-chlorophenylpiperazine and partial agonist activity of 8-OH-DPAT at the 5-HT(7) receptor." Eur J Pharmacol **396**(1): 1-8.

- Xu, Y. y cols (2004). "Selective serotonin reuptake inhibitor disrupts organization of thalamocortical somatosensory barrels during development." Brain Res Dev Brain Res **150**(2): 151-161.
- Yan, W. y cols (1997). "5-HT1a receptors mediate the neurotrophic effect of serotonin on developing dentate granule cells." Brain Res Dev Brain Res **98**(2): 185-190.
- Yan, W. y cols (1997). "Effects of neonatal serotonin depletion on the development of rat dentate granule cells." Brain Res Dev Brain Res **98**(2): 177-184.
- Yang, N. y cols (1998). "Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization." Nature **393**(6687): 809-812.
- Yoshimura, T. y cols (2006). "Ras regulates neuronal polarity via the PI3-kinase/Akt/GSK-3beta/CRMP-2 pathway." Biochem Biophys Res Commun **340**(1): 62-68.
- Yoshimura, T. y cols (2005). "GSK-3beta regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity." Cell **120**(1): 137-149.
- Yuen, E. Y. y cols (2005). "Serotonin 5-HT1A receptors regulate NMDA receptor channels through a microtubule-dependent mechanism." J Neurosci **25**(23): 5488-5501.