



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**EVALUACIÓN DEL SISTEMA SEROTONINÉRGICO EN EL NÚCLEO DEL
RAFÉ DORSAL Y CAMBIOS ASOCIADOS CON LA EDAD EN EL HUMANO.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS

PRESENTA

JESÚS CIENFUEGOS MEZA

TUTORA DE TESIS

DRA. LUISA L. ROCHA ARRIETA

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS, UNIDAD COAPA

COMITÉ TUTORIAL

DRA. ROSALINDA GUEVARA GUZMÁN

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, UNAM

DRA. CAROLINA ESCOBAR BRIONES

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA, UNAM

DRA. SANDRA ADELA OROZCO SUÁREZ

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS,

HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CMN SIGLO XXI, IMSS.

DRA. IRIS ANGÉLICA FERIA ROMERO

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS,

HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CMN SIGLO XXI, IMSS.

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX, OCTUBRE 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

1. LISTA DE ABREVIATURAS	4
2. FIGURAS.....	4
3. RESUMEN.....	5
4. ANTECEDENTES	6
4.1. Núcleos del raquí.....	6
4.1.1. Grupo caudal	6
4.1.2. Grupo rostral	6
4.2. Núcleo del raquí dorsal (DRN)	7
4.2.1. Proyecciones del DRN	7
4.2.1.1. Proyecciones aferentes	7
4.2.1.2. Proyecciones eferentes	7
4.3. Serotonina.....	8
4.4. Receptores de 5-HT.....	9
4.4.1. Receptor 5-HT _{1A}	10
4.5. Cambios en el sistema serotoninérgico del tallo cerebral: 5-HT y receptor 5-HT _{1A} .	
.....	12
4.5.1. Influencia de la edad en la 5-HT y el receptor 5-HT _{1A} en el tallo cerebral .	12
4.5.2. Cambios de la 5-HT y el autorreceptor 5-HT _{1A} en los núcleos del raquí	
humano en condiciones patológicas	14
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
5.1. Pregunta de investigación.....	18
6. JUSTIFICACIÓN	18
7. HIPÓTESIS	19
8. OBJETIVOS.....	19
8.1. Objetivo general	19
8.2. Objetivos específicos.....	19
9. METODOLOGÍA	20
9.1. Diseño del estudio	20
9.2. Sujetos de estudio.....	20
9.3. Manipulación del tejido.....	20
9.4. Procedimientos experimentales.....	21
9.4.1. Histología	21
9.4.2. Autorradiografía cuantitativa	22
9.4.3. Autorradiografía funcional.....	23
9.4.4. Cuantificación tisular 5-HT y 5-HIAA	24
9.4.4.1. Extracción de aminas	25
9.4.4.2. Extracción de proteínas	25
9.4.4.3. Recambio de 5-HT	26
9.4.5. Análisis estadístico.....	26
9.4.5.1. Tamaño de la muestra	26
9.4.5.2. Análisis estadístico.....	26
10. CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	26
11. RESULTADOS.....	26
11.1. Muestras.....	26
11.2. Histología.....	27

11.3. Los niveles caudales del DRN presentan mayor unión al autorreceptor 5-HT _{1A} ..	28
11.4. Los niveles caudales del DRN muestran mayor estimulación de la proteína G _i acoplada al autorreceptor 5-HT _{1A}	30
11.5. La concentración tisular de 5-HT y 5-HIAA y el recambio de 5-HT son similares a lo largo del DRN.....	31
11.6. La edad influye en la unión al autorreceptor 5-HT _{1A} , la estimulación de la proteína G _i acoplada al autorreceptor, la concentración y recambio de 5-HT a nivel del DRN....	32
12. DISCUSIÓN.....	34
12.1. Existe mayor unión al autorreceptor 5-HT _{1A} en los niveles caudales del DRN	34
12.2. Hay mayor estimulación de la proteína G _i acoplada al autorreceptor 5-HT _{1A} en los niveles caudales del DRN.....	35
12.3. Niveles tisulares de 5-HT y 5-HIAA y recambio de 5-HT.....	36
12.4. Influencia de la edad en el sistema serotoninérgico del DRN	36
12.5. Implicaciones clínicas	37
13. CONCLUSIONES.....	38
14. AGRADECIMIENTOS	38
15. REFERENCIAS	39

1. LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT:	Serotonina
5-HT_{1A}:	Receptor 1A de serotonina
5-HIAA:	Ácido 5-hidroxiindoleacético
8-OH-DPAT:	8-hidroxi-(2-N,N-dipropilamino)-tetralina
[³H]:	Tritio
[³H]8-OH-DPAT:	8-OH-DPAT marcado con tritio
[³⁵S]GTPγS:	5'-(γ-[³⁵ S]tiotriofosfato)
CINVESTAV:	Centro de Investigación y Estudios Avanzados
DRN:	Núcleo del rafé dorsal
DRc:	Núcleo caudal del rafé dorsal
DRd:	Núcleo dorsal del rafé dorsal
DRif:	Núcleo interfascicular del rafé dorsal
DRv:	Núcleo ventral del rafé dorsal
DRvl:	Núcleo ventrolateral del rafé dorsal
GPCR:	Receptor acoplado a proteínas G (<i>G protein-coupled receptor</i>)
SEMEFO:	Servicio Médico Forense

2. FIGURAS

Tabla 1. Subtipos de receptores de serotonina	10
Tabla 2. Estudios de unión al receptor 5-HT _{1A} en núcleos del rafé humano mediante autorradiografía in vitro	17
Tabla 3. Condiciones para los experimentos de autorradiografía cuantitativa.....	22
Tabla 4. Casos analizados	27
Tabla 5. Unión de [³ H]8-OH-DPAT al receptor 5-HT _{1A} en subnúcleos del rafé dorsal del mesencéfalo y puente humano	29
Tabla 6. Porcentaje de proteínas G _i activas y acopladas al autorreceptor 5-HT _{1A} en subnúcleos del rafé dorsal del mesencéfalo y puente humano.....	31
Tabla 7. Concentración tisular de 5-HT y 5-HIAA por nivel analizado del rafé dorsal	32
Tabla 8. Correlación entre edad de los sujetos de estudio, unión al autorreceptor 5-HT _{1A} , estimulación de la proteína G _i acoplada al autorreceptor 5-HT _{1A} y niveles tisulares de 5-HT y 5-HIAA en el núcleo del rafé dorsal.....	33
Figura 1. Cambios en el sistema serotoninérgico con edad y género.	13
Figura 2. Localización neuroanatómica del núcleo del rafé dorsal humano	21
Figura 3. Secuencia de autorradiografía cuantitativa para receptores.....	23
Figura 4. Evaluación del autorreceptor 5-HT _{1A} por autorradiografía	24
Figura 5. Núcleo del rafé dorsal humano, localización neuroanatómica y expresión del autorreceptor 5-HT _{1A} y la proteína G _i acoplada.....	28
Figura 6. Unión al receptor 5-HT _{1A} en el rafé dorsal humano	30
Figura 7. Estimulación de la proteína G _i acoplada al receptor 5-HT _{1A} en el rafé dorsal humano	31

3. RESUMEN

INTRODUCCIÓN: El sistema serotoninérgico está involucrado en un gran número de funciones complejas del sistema nervioso central. El núcleo del rafé dorsal (DRN) es el principal centro productor de serotonina cerebral. La actividad de las neuronas serotoninérgicas en las distintas subdivisiones del DRN está regulada por el autorreceptor 5-HT_{1A}. Se desconocen los cambios asociados con la edad en la transmisión serotoninérgica del rafé dorsal humano, particularmente entre la capacidad de unión al autorreceptor 5-HT_{1A}, la activación de la proteína G_i acoplada y los cambios en el contenido tisular de 5-HT.

MÉTODOS: Estudio postmortem. Se realizaron cuatro experimentos: 1) histología, para determinar la situación neuroanatómica del DRN; 2) autorradiografía cuantitativa, para evaluar la unión al autorreceptor 5-HT_{1A} por un agonista específico marcado con tritio ([³H]8-OH-DPAT); 3) autorradiografía funcional, para evaluar la estimulación de la proteína G_i acoplada; y 4) cuantificación tisular de 5-HT y su metabolito 5-HIAA.

RESULTADOS: El DRN se delimitó en cuatro niveles rostro caudales. A partir del nivel 2 se observó mayor unión al autorreceptor 5-HT_{1A} y mayor estimulación de la proteína G_i acoplada. El recambio de 5-HT fue similar a lo largo del DRN. A mayor edad se encontró mayor activación de la proteína G_i en el nivel 2, con disminución en el recambio de 5-HT.

DISCUSIÓN: Existen cambios, a mayor edad, en la unión al receptor 5-HT_{1A} y la activación de la proteína G_i en niveles caudales del DRN. El metabolismo de 5-HT es menor en el nivel medio-rostral. Los subnúcleos DRc, DRv, DRvl y DRif del nivel 2 muestran gran conectividad con regiones telencefálicas involucradas en funciones fisiológicas del ser humano.

CONCLUSIÓN: Los cambios asociados con la edad en el sistema serotoninérgico pueden subyacer y favorecer el desarrollo de trastornos neuropsiquiátricos en la población de adultos mayores.

EVALUACIÓN DEL SISTEMA SEROTONINÉRGICO EN EL NÚCLEO DEL RAFÉ DORSAL Y CAMBIOS ASOCIADOS CON LA EDAD EN EL HUMANO.

4. ANTECEDENTES

4.1. Núcleos del rafé

Los núcleos del rafé son colecciones de neuronas con límites citoestructurales poco definidos. En el humano, se ubican a lo largo del eje rostrocaudal de la línea media dorsal del tallo cerebral y están estrechamente relacionados con la formación reticular, dando lugar a lo que algunos autores denominan *la división media de la formación reticular* (Hornung, J.-P. 2003, 2012; Olszewski, J. and Baxter, D. 1954; Paterson, D. S., Belliveau, R. A. et al. 2004; Paxinos, G. and Huang, X. F. 2013). Estos núcleos contienen una población neuronal heterogénea, con distintas características morfológicas, neuroquímicas y de proyección. Las neuronas serotoninérgicas son el principal constituyente de los núcleos del rafé (Hornung, J.-P. 2003).

Los primeros estudios que establecieron las divisiones de los núcleos del rafé se basaron en las características citoestructurales en modelos animales (Meesen, H. and Olszewski, J. 1949; Taber, E., Brodal, A. et al. 1960) y, posteriormente, en el tallo cerebral humano (Olszewski, J. and Baxter, D. 1954). Con base en su distribución y proyecciones principales, los núcleos del rafé se pueden dividir en dos grupos, cuya división comprende varios núcleos, con proyecciones paralelas y complementarias entre sí. A continuación se describen ambos grupos en relación caudal a rostral, ya que este último contiene los núcleos de interés para el presente trabajo (Hornung, J.-P. 2003).

4.1.1. Grupo caudal

Está constituido por tres núcleos y un grupo neuronal en la formación reticular lateral, los cuales representan un 15% del total de la población de neuronas serotoninérgicas. Estas neuronas se encuentran separadas del grupo rostral por un espacio en la mitad del puente con ausencia de neuronas que contienen serotonina (Hornung, J.-P. 2003). El grupo caudal se extiende desde la porción caudal del puente hasta la médula oblongada. Este grupo tiene conexiones neuronales con otras áreas caudales del tallo cerebral y con la médula espinal. Entre las funciones que modulan se encuentra el control respiratorio, la función cardiovascular, la termorregulación y analgesia (Kinney, H. C., Belliveau, R. A. et al. 2007). Los núcleos que conforman el grupo caudal son: a) el núcleo del rafé magno (RMg), localizado adyacente a la línea media, por encima del lemnisco medial, a nivel del núcleo del facial; b) el núcleo del rafé oscuro (ROb) que se ubica cerca de la línea media, en toda la extensión dorsal de la médula oblongada; y c) el núcleo del rafé pálido (RPa), que representa el agregado neuronal más pequeño (cerca de 1000 neuronas), y se ubica cercano a la línea media, entre la decusación de las pirámides y el lemnisco medial (Hornung, J.-P. 2003).

4.1.2. Grupo rostral

Este grupo, que representa el 85% de todas las neuronas serotoninérgicas encefálicas, se ubica en el mesencéfalo y la porción rostral del puente, cuyas proyecciones al telencéfalo están implicadas en la regulación de la atención, cognición, ánimo y función motora (Hornung, J.-P. 2003). Está constituido por tres núcleos. El núcleo caudal linear (CLi) se encuentra en la porción más rostral del mesencéfalo, en el área del tegmento ventral, dorsal y caudal al núcleo interpeduncular (Halliday, G. M. and Tork, I. 1986).

El núcleo del raquí medial (MnR) se extiende desde el límite caudal de la decusación de los pedúnculos cerebelosos superiores hasta el núcleo motor del trigémino. Está dividido, a su vez, en una región medial (MnR propiamente) complementado en su mitad caudal por una región paramedial, y de dos extensiones laterales en la formación reticular: el núcleo pontis oralis (PnO), dorsalmente, y el núcleo supraleminisco (SuL), ventralmente (Baker, K. G., Halliday, G. M., Halasz, P. et al. 1991).

Finalmente, el núcleo del raquí dorsal (DRN) se localiza desde la porción ventral del mesencéfalo, a nivel del núcleo oculomotor, hasta la porción rostral media del puente (Hornung, J.-P. 2012). Cerca del 80% de la síntesis de serotonina de los núcleos del raquí se produce en el DRN, mientras que el 10 a 20% restante se produce en la porción de la médula oblongada (Hornung, J.-P. 2012). El presente proyecto se enfoca en este núcleo, por lo que se realizará a continuación una descripción detallada de su neuroanatomía, conectividad y funciones descritas.

4.2. Núcleo del raquí dorsal (DRN)

El DRN contiene la mayor población de neuronas serotoninérgicas en el tallo cerebral humano, de aproximadamente 165,000 neuronas (Baker, K. G., Halliday, G. M., Halasz, P. et al. 1991). Análisis de cortes histológicos con tinción de Nissl e inmunohistoquímica para PH8 (anticuerpo contra la tirosina hidroxilasa), han permitido localizar neuronas serotoninérgicas, en distintas proporciones, en todas las subdivisiones anatómicas del DRN (Baumann, B., Biela, H. et al. 2002; Matthews, P. R. and Harrison, P. J. 2012; Underwood, M. D., Khaibulina, A. A. et al. 1999).

La mayoría de las neuronas serotoninérgicas del DRN se localizan en la mitad rostral, distribuidos en las subdivisiones dorsal (DRd), ventral (DRv), interfascicular (DRif) y ventrolateral (DRvl) (Baker, K. G., Halliday, G. M. et al. 1990). Una delgada línea doble de células conforma la subdivisión caudal del DRN (DRc), el cual se extiende caudalmente hasta el núcleo abducens. De forma lateral, las neuronas del DRvl son contiguas con aquellas del MnR en la formación reticular lateral (Hornung, J.-P. 2012).

4.2.1. Proyecciones del DRN

4.2.1.1. Proyecciones aferentes

Las proyecciones aferentes al DRN (y también al MnR), se originan de estructuras telencefálicas del sistema límbico. Existen proyecciones glutamatérgicas aferentes originadas en la habénula lateral, el núcleo interpeduncular, varios núcleos hipotalámicos, el área del tegmento ventral, el núcleo del tegmento laterodorsal y la corteza del cíngulo (Behzadi, G., Kalen, P. et al. 1990; Peyron, C., Petit, J. M. et al. 1998). Además, existe una inervación GABAérgica abundante al DRN (Wang, Q. P., Ochiai, H. et al. 1992). Ambos núcleos (DRN y MnR) reciben proyecciones de neuronas no colinérgicas del septum medial y de la banda diagonal de Broca (Kalen, P. and Wiklund, L. 1989), la amígdala y el pálido ventral (Behzadi, G., Kalen, P. et al. 1990; Peyron, C., Petit, J. M. et al. 1998).

El DRN tiene en sí mismo (auto)inervación serotoninérgica: se ha demostrado la presencia de axones que provienen de neuronas serotoninérgicas del propio DRN o de otras partes del complejo del raquí y existe evidencia de un mecanismo dendrodendrítico de liberación de 5-HT. Esta autoinervación serotoninérgica es fundamental para modular la síntesis y liberación de la misma 5-HT. (Andrade, R., Huereca, D. et al. 2015; Chazal, G. and Ralston, H. J., 3rd 1987; Stamford, J. A., Davidson, C. et al. 2000).

4.2.1.2. Proyecciones eferentes

La división rostral del DRN tiene conexiones con distintas áreas de la corteza cerebral, el neocórtex, la amígdala, el septum lateral y la sustancia negra (Corvaja, N., Doucet, G. et al. 1993; Steinbusch, H. W., van der Kooy, D. et al. 1980; van der Kooy, D. and Hattori, T. 1980; Wasselus, M., Galvez, J. P. et al. 2006; Waterhouse, B. D., Mihailoff, G. A. et al. 1986), mientras que la división caudal se proyecta al hipocampo, la corteza entorrinal y el locus coeruleus (Datiche, F., Luppi, P. H. et al. 1995; Imai, H., Steindler, D. A. et al. 1986; Kohler, C. and Steinbusch, H. 1982). El DRN también mantiene conexiones con el tálamo (Datiche, F., Luppi, P. H. et al. 1995; Imai, H., Steindler, D. A. et al. 1986; Kirifides, M. L., Simpson, K. L. et al. 2001; Kohler, C. and Steinbusch, H. 1982), el epéndimo y el órgano sub-comisural (Mikkelsen, J. D., Hay-Schmidt, A. et al. 1997), varios núcleos del tallo cerebral (Halberstadt, A. L. and Balaban, C. D. 2007; Kirifides, M. L., Simpson, K. L. et al. 2001; Li, Y. Q., Takada, M. et al. 1993; Steininger, T. L., Wainer, B. H. et al. 1997; Thompson, A. M., Moore, K. R. et al. 1995; Underwood, M. D., Arango, V. et al. 1999), y la médula espinal (Kazakov, V. N., Kravtsov, P. et al. 1993; Li, Y. Q., Takada, M. et al. 1993).

Gracias al gran sistema de conexiones neuronales, se ha demostrado que el DRN está involucrado en una gran cantidad de procesos fisiológicos y patológicos, en los que la serotonina (5-HT) mantiene un rol preponderante (Hornung, J.-P. 2012). Es importante recapitular el rol fisiológico de este neurotransmisor, para, posteriormente, enfocar la atención a su modulación en el DRN.

4.3. Serotonina

La serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT) es un neurotransmisor del grupo de las indoleaminas, implicado en la regulación de múltiples procesos fisiológicos cerebrales y de comportamiento (Brunton, L. L. 2018; Commons, K. G. 2016), incluyendo la ansiedad, depresión, agresión, sueño, memoria y mecanismos de recompensa (Lucki, I. 1998). La síntesis y almacenamiento neuronal de la 5-HT se localiza, principalmente, en las neuronas del rafe en el tallo cerebral. La 5-HT ocupa un lugar destacado en la neurofarmacología debido a su ubicuidad cerebral, los procesos neurofisiológicos en los que participa y al gran número de fármacos que actúan sobre las vías serotoninérgicas, desarrollados principalmente para el tratamiento de los trastornos del estado de ánimo, entre otras (Purves, D. 2012).

La 5-HT se sintetiza a partir del triptófano, aminoácido esencial que es absorbido por las neuronas mediante un transportador de membrana, en una reacción de dos pasos. Primero, el triptófano es hidroxilado en una reacción catalizada por la enzima triptófano hidroxilasa (TPH), isoforma 2 (TPH2), que representa la enzima que limita la velocidad de la vía sintética y es la isoforma específica localizada en el sistema nervioso. El resultado es 5-hidroxitriptófano, el cual posteriormente se convierte, mediante la L-aminoácido descarboxilasa aromática (AADC), en 5-HT (Brunton, L. L. 2018; Purves, D. 2012).

La 5-HT se acumula en gránulos secretores presinápticos mediante un monoaminotransportador vesicular (VMAT2). Los cúmulos de 5-HT son liberados de la neurona serotoninérgica por exocitosis, en respuesta a un potencial de acción. Los efectos de la 5-HT liberada en el espacio sináptico son interrumpidos por la captación neuronal mediante el transportador específico de 5-HT (SERT, *serotonin transporter*) (Purves, D. 2012). Posterior a la recaptura en el espacio sináptico, la 5-HT sigue dos vías: 1) vuelve a ser almacenada en vesículas citoplásmicas por la VMAT2, o 2) es degradada mediante desaminación oxidativa por la monoaminoxidasa A (MAO-A), enzima localizada en la membrana mitocondrial externa. El aldehído intermedio, 5-hidroxi-3-indolacetaldehído (5-HIAL), es metabolizado a 5-hidroxi-3-ácido indolacético (5-HIAA) mediante la enzima aldehído deshidrogenasa tipo 2 (ALDH2). Una

vía alterna es la conversión a 5-hidroxitriptofol (5-HTOL) mediante aldehído reductasa (ALDR) o alcohol deshidrogenasa (ADH) (Brunton, L. L. 2018; Maximino, C. 2012).

La cantidad de 5-HT que es transportada o metabolizada se denomina recambio de 5-HT. La cantidad total de 5-HT, denominada reserva metabólica (*metabolic pool*), en una neurona serotoninérgica, no necesariamente disminuye al aumentar la descarga neuronal, ya que la síntesis del neurotransmisor puede aumentar al mismo tiempo, logrando un equilibrio entre el índice de liberación y catabolismo. Por otro lado, la reserva metabólica de 5-HT también puede ser liberada y recapturada a ritmo constante. En ambos casos, la concentración total de 5-HT no mostrará cambios, sin embargo, el nivel de recambio de 5-HT ha sido marcadamente alterada. En otras palabras, el recambio de 5-HT refleja fielmente la actividad funcional de las neuronas en las que la 5-HT actúa (Korf, J. 1981). La tasa de recambio es un mejor indicador de la actividad neuronal y de la concentración neurotransmisor-receptor, que los niveles tisulares del neurotransmisor (Neff, N. H. and Tozer, T. N. 1968).

En resumen, en el sistema nervioso central, la 5-HT mantiene un papel fundamental como neurotransmisor. La síntesis de hasta el 80% de 5-HT se localiza en el DRN y su liberación se da tanto en terminales sinápticas de los sitios de proyección eferente como a través de varicosidades no sinápticas distribuidas a lo largo del axón serotoninérgico (Haggarty, S. J. and Perlis, R. H. 2017). La 5-HT liberada en el espacio sináptico interactúa con receptores específicos localizados en la neurona postsináptica. Las consecuencias fisiológicas de la liberación de 5-HT varían según el área del cerebro, el elemento neuronal involucrado y los subtipos de receptores de 5-HT expresados (Bockaert, J., Claeysen, S. et al. 2006). La 5-HT ejerce acciones directas de excitación e inhibición incluso en un mismo grupo neuronal, pero con patrones temporales distintos y de acuerdo con el tipo de receptor al que se acopla (Brunton, L. L. 2018; Filip, M. and Bader, M. 2009). La 5-HT tiene diversas funciones, incluyendo hormona tisular, mitógeno, neurotransmisor y neuromodulador (Fidalgo, S., Ivanov, D. K. et al. 2013). Además presenta un rol preponderante en el desarrollo cerebral: el sistema serotoninérgico es el primer sistema neurotransmisor en desarrollarse en primates (Levitt, P. and Rakic, P. 1982) y modula aspectos del desarrollo y diferenciación neural temprano, incluyendo el crecimiento dendrítico y la sinaptogénesis (Mazer, C., Muneyyirci, J. et al. 1997; Wirth, A., Holst, K. et al. 2017).

4.4. Receptores de 5-HT

La gran cantidad de efectos fisiológicos desencadenados por la 5-HT se produce mediante su acción en 14 subtipos de receptores distintos conocidos a la fecha, clasificados en siete familias (5-HT₁ a 5-HT₇), 13 de los cuales son miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR, *G protein coupled receptors*) y uno es inotrópico (5-HT₃), ligado a conductos iónicos que modulan iones de Na⁺ y K⁺ (Berger, M., Gray, J. A. et al. 2009; Hoyer, D., Clarke, D. E. et al. 1994).

Los GPCR comprenden la mayoría de los receptores para hormonas peptídicas, neurotransmisores, prostanoides, odorantes e, incluso, la luz (Nichols, D. E. and Nichols, C. D. 2008). Estos receptores son una familia de proteínas heterotriméricas reguladoras y ligadas al nucleótido de guanina, que ejercen su función mediante la activación de segundos mensajeros. Los GPCR ejercen un papel esencial en los procesos de señalización intercelular y en mecanismos regulatorios (Gainetdinov, R. R., Premont, R. T. et al. 2004; Nichols, D. E. and Nichols, C. D. 2008; Rodríguez-Puertas, R., González-Maeso, J. et al. 2000).

En la tabla 1 se describen los diferentes receptores de 5-HT, su localización y las cascadas transduccionales a las que están acoplados para inducir sus efectos intracelulares. Los receptores de 5-HT acoplados a la proteína G_{ai} son los tipos 5-HT₁ y 5-HT₅. La subfamilia 5-HT₁ está

compuesta por los subtipos 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, y 5-HT_{1F}, todos ellos acoplados a la proteína G α_i (Sosunov, A. A., Wu, X. *et al.*). Su activación conlleva la inhibición de la adenilato ciclasa (AC) y posterior disminución de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) intracelular (Bockaert, J., Homburger, V. *et al.* 1987). Para una revisión más extensa, consultar (Nichols, D. E. and Nichols, C. D. 2008).

En el cerebro intacto, las funciones de muchos receptores a 5-HT se asocian con respuestas fisiológicas específicas, que varían de la modulación de la actividad neuronal a la liberación de neurotransmisores y cambios en el comportamiento (Barnes, N. M. and Sharp, T. 1999). Las alteraciones en la función de estos receptores se asocian con numerosos trastornos neuropsiquiátricos, como trastorno depresivo, trastornos de ansiedad, esquizofrenia, trastornos de alimentación, entre otros. Los fármacos que actúan sobre receptores de 5-HT son efectivos en el tratamiento de estas condiciones (Purves, D. 2012).

Es de relevancia que algunos receptores de 5-HT se expresan como autorreceptores. Éstos son receptores cuya función depende de la unión a un ligando específico liberado por la misma neurona (McDevitt, R. A. and Neumaier, J. F. 2011). La activación del autorreceptor modula la actividad neuronal al inducir mecanismos de retroalimentación, generalmente negativa, para modificar la síntesis o liberación de un neurotransmisor (Kuczynski, B. and Kolakowsky-Hayner, S. A. 2011a; Raiteri, M. 2001). Los receptores a 5-HT también pueden expresarse en neuronas no-serotoninérgicas postsinápticas, como heterorreceptores. Estos se definen como receptores localizados en una terminal nerviosa que al activarse estimulan o inhiben la actividad neuronal o de otros neurotransmisores postsinápticos diferentes a la 5-HT (Kuczynski, B. and Kolakowsky-Hayner, S. A. 2011b; Meyer, J. S. 1997; Raiteri, M. 2001).

A continuación, se detalla un receptor particular, 5-HT_{1A}, el cual es el principal autorreceptor encontrado en los núcleos de neuronas serotoninérgicas del DRN.

Tabla 1. Subtipos de receptores de serotonina

Receptor	Proteína G acoplada	Mecanismo transduccional	Localización
5-HT _{1A}	G α_i /G α_o	Inhibe AC Modula GIRK	Autorreceptor somatodendrítico en núcleos del rañé Heterorreceptor en regiones límbicas y neocorticales
5-HT _{1B}	G α_i /G α_o	Inhibe AC	Ganglios basales
5-HT _{1D}	G α_i /G α_o	Inhibe AC	Ganglios basales
5-HT _{1E}	G α_i /G α_o	Inhibe AC	Corteza, caudado, putamen
5-HT _{1F}	G α_i /G α_o	Inhibe AC	Hipocampo, corteza, núcleo del rañé dorsal
5-HT _{2A}	G α_q	Activa PLC	Corteza, ganglios basales
5-HT _{2B}	G α_q	Activa PLC	Extracerebral, cerebelo
5-HT _{2C}	G α_q	Activa PLC	Plexos coroides, corteza
5-HT ₃	Inotrópico	Excitación postsináptica	Corteza, hipocampo
5-HT ₄	Acoplado a AC	Activa AC	Colículos, hipocampo
5-HT _{5A}	G α_i /G α_o	Inhibe AC	No neuronal
5-HT _{5B}	?	Desconocido	?
5-HT ₆	G α_s /G α_o	Activa AC5	Estriado, N. Accumbens, hipocampo
5-HT ₇	G α_s	Activa AC5	Hipotálamo, tálamo, hipocampo, corteza

AC: Adenilato ciclasa; PLC: Fosfolipasa C; GIRK: Canal de K⁺ rectificador interno ligado a proteína G

Modificado de: Gray JA & Roth BL. in: *Handbook of Contemporary Neuropharmacology*. 2007; Barnes NM & Sharp T. *Neuropharmacology* (1999); 38:1083–1152.

4.4.1. Receptor 5-HT_{1A}

El receptor 5-HT_{1A} es uno de los receptores de 5-HT mejor caracterizados (Barnes, N. M. and Sharp, T. 1999). La identificación del agonista selectivo 8-hidroxi-(2-N,N-dipropilamino)-tetralina (8-OH-DPAT) y la síntesis de [³H]-8-OH-DPAT, permitieron identificar el perfil

farmacológico del sitio de unión al receptor 5-HT_{1A} (Gozlan, H., El Mestikawy, S. *et al.* 1983; Hjorth, S., Carlsson, A. *et al.* 1982). Estudios farmacológicos y clínicos han demostrado que el receptor 5-HT_{1A} muestra la mayor afinidad por la 5-HT dentro de la familia de receptores a 5-HT (Banerjee, P., Mehta, M. *et al.* 2007; Nichols, D. E. and Nichols, C. D. 2008).

El gen que codifica el receptor 5-HT_{1A} humano se localiza en el cromosoma 5 (5q11.2-q13) y no contiene intrones (Barnes, N. M. and Sharp, T. 1999). El receptor consiste en una cadena polipeptídica única de 422 aminoácidos que se integra en la membrana plasmática mediante siete dominios transmembranales hidrofóbicos de hélices α , con una terminal amino (N) en la porción extracelular y una terminal carboxilo (C) intracelular (Lanfumeu, L. and Hamon, M. 2004).

Estudios de inmunohistoquímica y autorradiografía han demostrado que la mayoría de las neuronas serotoninérgicas en el DRN expresan el receptor 5-HT_{1A}, tanto en ratas (Day, H. E., Greenwood, B. N. *et al.* 2004; Sotelo, C., Cholley, B. *et al.* 1990), como en humanos (Hall, H., Lundkvist, C. *et al.* 1997; Ito, H., Halldin, C. *et al.* 1999; Marazziti, D., Marracci, S. *et al.* 1994; Matthews, P. R. and Harrison, P. J. 2012). En el DRN, el autorreceptor 5-HT_{1A} se distribuye en la membrana plasmática del soma y las dendritas neuronales (Celada, P., Adell, A. *et al.* 2006). Por lo tanto, la actividad de las neuronas del DRN está regulada por los autorreceptores 5-HT_{1A} y la recaptura de 5-HT del espacio sináptico (McDevitt, R. A. and Neumaier, J. F. 2011; Stamford, J. A., Davidson, C. *et al.* 2000). La activación del autorreceptor 5-HT_{1A} induce la supresión del potencial de acción neuronal, esto disminuye la síntesis de 5-HT en el DRN y, en consecuencia, su liberación en el espacio sináptico eferente (Polter, A. M. and Li, X. 2010; Sprouse, J. S. and Aghajanian, G. K. 1987). Cabe mencionar que la inhibición neuronal mediada por el autorreceptor 5-HT_{1A} muestra diferencias regionales dentro del DRN, siendo mayor en las subregiones laterales y ventrocaudales del DRN (Commons, K. G. 2008).

El receptor 5-HT_{1A} está acoplado a proteínas G inhibitorias (G_{i/o}) (De Vivo, M. and Maayani, S. 1986). La unión de un agonista al receptor produce el intercambio de difosfato de guanina (GDP) por trifosfato de guanina (GTP) en la subunidad α de G_{i/o}, lo que facilita la inhibición de la acetilcolina (AC) y, finalmente, disminución en la producción de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) y actividad de adeninafosfocinasa (PKA) (Polter, A. M. and Li, X. 2010). Por otro lado, el complejo formado por las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G, una vez desacoplado de la subunidad α , activa el canal de K⁺ rectificador interno ligado a proteína G (GIRK, *G protein-coupled inward rectifying potassium channel*). Su activación induce la hiperpolarización neuronal, disminuyendo la excitabilidad y descarga neuronal (Andrade, R., Malenka, R. C. *et al.* 1986; Kooover, A. and Lester, H. A. 2002). En las neuronas del raquí dorsal, la activación del receptor 5-HT_{1A} también inhibe directamente las corrientes de voltaje dependientes de calcio (Hensler, J. G. 2003). Además, la estimulación del receptor 5-HT_{1A} puede activar otras cascadas transduccionales, con efectos sustanciales, como la vía de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la vía del fosfatidilinositol-3-cinasa/proteína cinasa B (PI3K/Akt) (Barnes, N. M., Ahern, G. P. *et al.* 2021; Polter, A. M. and Li, X. 2010).

La activación de los autorreceptores 5-HT_{1A}, con localización somatodendrítica en las neuronas del raquí dorsal, disminuye la síntesis de serotonina y su liberación en regiones terminales como el hipocampo y la neocorteza. Por lo tanto, la activación de este autorreceptor disminuye la neurotransmisión mediada por 5-HT (Barnes, N. M., Ahern, G. P. *et al.* 2021). Por otro lado, en roedores, la activación del autorreceptor 5-HT_{1A} induce actividad ansiolítica en pruebas de comportamiento (Akimova, E., Lanzemberger, R. *et al.* 2009; De Vry, J., Schreiber, R. *et al.* 2004). La activación sostenida del receptor 5-HT_{1A} induce su desensibilización e internalización en la membrana, lo que modula el tono serotoninérgico cerebral a largo plazo.

Esto se traduce en disminución de síntomas depresivos y ansiosos en humanos (Yohn, C. N., Gergues, M. M. et al. 2017).

Como heterorreceptor, el receptor 5-HT_{1A} se expresa en distintas regiones cerebrales, especialmente del sistema límbico y la neocorteza (Pazos, A., Probst, A. et al. 1987a). Además, la gran densidad de expresión en áreas densamente inervadas por proyecciones serotoninérgicas y la gran afinidad por la 5-HT, convierten al heterorreceptor 5-HT_{1A} en el principal receptor inhibitorio cerebral (Carhart-Harris, R. L. and Nutt, D. J. 2017). Estos mecanismos repercuten en distintas funciones fisiológicas y de comportamiento en el ser humano. El receptor 5-HT_{1A} está implicado en el desarrollo temprano de regiones cerebrales que regulan el estado de ánimo y ansiedad (Altieri, S. C., Garcia-Garcia, A. L. et al. 2013). En el humano adulto, el receptor está implicado tanto en comportamientos ansioso-depresivos y procesos cognitivos (Millan, M. J., Agid, Y. et al. 2012; Ogren, S. O., Eriksson, T. M. et al. 2008) como en la regulación del sistema cardiovascular (Saxena, P. R. and Villalon, C. M. 1990), respuestas neuroendocrinas (Fletcher, A., Forster, E. A. et al. 1996), temperatura corporal (Overstreet, D. H. 2002), regulación del sueño (Bjorvatn, B. and Ursin, R. 1998), neurogénesis (Radley, J. J. and Jacobs, B. L. 2002) y estado de ánimo (Sibille, E. and Hen, R. 2001).

4.5. Cambios en el sistema serotoninérgico del tallo cerebral: 5-HT y receptor 5-HT_{1A}

4.5.1. Influencia de la edad en la 5-HT y el receptor 5-HT_{1A} en el tallo cerebral

En corteza cerebral humana, se han reportado concentraciones estables de 5-HT y su metabolito (5-HIAA) durante el envejecimiento fisiológico (Mattson, M. P., Maudsley, S. et al. 2004; Morgan, D. G., May, P. C. et al. 1987; Wester, P., Hardy, J. A. et al. 1984). Sin embargo, a mayor edad existe menor unión del agonista [³H]8-OH-DPAT con el heterorreceptor 5-HT_{1A} (Arango, V., Underwood, M. D. et al. 1995). Estudios en humanos han demostrado que la expresión proteica, genética y los sitios de unión a los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B/D} y 5-HT_{2A}, disminuyen con la edad, especialmente en corteza cerebral (Meltzer, C. C., Smith, G. et al. 1998; Rehman, H. U. and Masson, E. A. 2001). Resultados obtenidos de estudios con tomografía por emisión de positrones (PET), usando un antagonista específico del receptor 5-HT_{1A} (WAY-100635), indican que la unión al receptor disminuye 10% por década en la neocorteza cerebral de humanos (Moller, M., Jakobsen, S. et al. 2007; Tauscher, J., Verhoeff, N. P. et al. 2001).

Palmer y colaboradores sugieren que los niveles de 5-HT en el tallo cerebral se mantienen estables con la edad, de manera similar a la neocorteza cerebral (Palmer, A. and DeKosky, S. 1998). Sin embargo, existen evidencias indicando disminución en los niveles tisulares de 5-HT y 5-HIAA en el tallo cerebral (Bucht, G., Adolfsson, R. et al. 1981; Carlsson, A., Adolfsson, R. et al. 1980; Goldstein, M. 1980; Palmer, A. M. and DeKosky, S. T. 1993; Pare, C. M., Yeung, D. P. et al. 1969).

Los niveles cerebrales de 5-HT dependen de las células serotoninérgicas del tallo cerebral, las cuales están reguladas por la activación de autorreceptores 5-HT_{1A} a este nivel. En el tallo cerebral humano se ha demostrado que la unión al receptor 5-HT_{1A} disminuye con la edad (Meltzer, C. C., Drevets, W. C. et al. 2001a). En hembras primates, este fenómeno se ha asociado con la disminución de estrógenos (Lu, N. Z. and Bethea, C. L. 2002; Pecins-Thompson, M. and Bethea, C. L. 1999). Sin embargo, otros estudios no han encontrado asociación entre la edad y la capacidad de unión al receptor 5-HT_{1A} en el rafé dorsal (Parsey, R. V., Oquendo, M. A. et al. 2002; Rabiner, E. A., Messa, C. et al. 2002). Es importante considerar que el uso de técnicas como la PET no permite la adecuada resolución de estructuras cerebrales pequeñas y profundas

se demostró que la unión al receptor varía de acuerdo al nivel y subnúcleo analizado (Pazos, A., Probst, A. et al. 1987b; Stockmeier, C. A., Shapiro, L. A. et al. 1996). Sin embargo, estas diferencias no han sido estudiadas respecto a la edad.

Como se mencionó anteriormente, la unión de un ligando al receptor induce cascadas de señalización intracelular, con distintas acciones resultantes. Es razonable considerar que la capacidad para inducir vías intracelulares de señalización también se modifica con la edad. Para evaluar esta capacidad de inducción de vías de señalización intracelulares, el ensayo de unión de [³⁵S]GTPγS permite evaluar y cuantificar la activación de las proteínas G acopladas a un receptor particular (Sim, L. J., Selley, D. E. et al. 1995).

Con esta técnica, Rodríguez-Puertas y cols. (2000) encontraron que, tanto la unión al autorreceptor 5-HT_{1A} como su capacidad de estimulación de la proteína G_i, muestran patrón anatómico similar, es decir, existe presencia de proteína G_i asociada con los receptores 5-HT_{1A}. Sin embargo, los autores no correlacionaron los datos obtenidos con la edad de los sujetos ni la capacidad de activación diferencial en los distintos subnúcleos del DRN (Rodríguez-Puertas, R., Gonzalez-Maeso, J. et al. 2000). Por otro lado, Serrats y cols. (2004) demostraron que el porcentaje de activación de la proteína G₁₀ acoplada al receptor 5-HT_{1A} inducido por 5-HT fue variable en distintas regiones cerebrales, siendo menor en el DRN a comparación del sector CA1 del hipocampo, giro dentado y corteza entorrinal (potencia, pEC₅₀=7.37±0.18 en CA1 vs 7.06±0.37 en el DRN, respectivamente). Dadas las características neuroanatómicas y farmacológicas demostradas en este estudio, los efectos inducidos por 5-HT en la activación de [³⁵S]GTPγS pueden haber sido mediados por el receptor 5-HT_{1A} (Hoyer, D. and Schoeffter, P. 1991; Pazos, A., Probst, A. et al. 1987a). Esto refleja que la activación diferencial de [³⁵S]GTPγS en el DRN, a comparación de otras estructuras supratentoriales, muestra diferencias en el acoplamiento a la proteína G_i, lo cual puede estar relacionado con la eficacia del tratamiento farmacológico en depresión y ansiedad (Serrats, J., Artigas, F. et al. 2004). La correspondencia entre la cantidad de autorreceptor 5-HT_{1A} en el DRN, su capacidad de activación de las vías de señalización intracelular a través de la proteína G_i y los cambios asociados con la edad, son importantes para entender la participación del sistema serotoninérgico en los mecanismos fisiopatológicos de distintas enfermedades neuropsiquiátricas y su respuesta a tratamiento farmacológico.

En resumen, existe evidencia contradictoria sobre los niveles totales de 5-HT y del autorreceptor 5-HT_{1A} en el DRN humano. Con la edad existe disminución de células serotoninérgicas sin cambio en la 5-HT total del DRN. Esto puede deberse a un decremento en la señalización del receptor 5-HT_{1A}, ya sea acoplamiento inadecuado o activación disminuida de la proteína G_i acoplada. Sin embargo, al presente se desconoce si la capacidad de activación de la proteína G_i acoplada al autorreceptor 5-HT_{1A} en el DRN humano también se modifica con la edad. En estructuras supratentoriales se sabe que la activación de la proteína G no siempre es paralela a la unión al receptor (Herkenham, M. 1987; Nijssen, P. C., Sexton, T. et al. 1992; Rocha, L., Orozco-Suarez, S. et al. 2009a). Creemos que este es el vínculo faltante para entender la regulación de la neurotransmisión serotoninérgica mediada por el autorreceptor 5-HT_{1A} y los cambios con la edad. Los cambios progresivos en la regulación de la neurotransmisión mediada por el receptor 5-HT_{1A} en el DRN durante el envejecimiento fisiológico pueden predisponer al desarrollo de uno, o más, trastornos neuropsiquiátricos (Mattson, M. P. and Arumugam, T. V. 2018).

4.5.2. Cambios de la 5-HT y el autorreceptor 5-HT_{1A} en los núcleos del rafé humano en condiciones patológicas

Los cambios relacionados con la edad en los niveles de 5-HT y el autorreceptor 5-HT_{1A} se asocian con cambios en la función cerebral y pueden ser factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades (Amenta, F., Zaccheo, D. et al. 1991; Mattson, M. P., Maudsley, S. et al. 2004). La alteración del sistema serotoninérgico con la edad se relaciona con cambios en comportamientos como el sueño, conducta sexual y estado de ánimo (Fidalgo, S., Ivanov, D. K. et al. 2013; Meltzer, C. C., Smith, G. et al. 1998).

Se sabe que pacientes con trastornos neuropsiquiátricos como enfermedad de Alzheimer, Parkinson, depresión y trastornos de ansiedad, muestran disminución en el componente serotoninérgico del DRN y neocorteza cerebral (Fidalgo, S., Ivanov, D. K. et al. 2013; Rehman, H. U. and Masson, E. A. 2001). En modelos animales, la edad, el estrés oxidativo y trastornos neurodegenerativos afectan el raqué dorsal a través de degeneración de fibras serotoninérgicas (Daubert, E. A. and Condrón, B. G. 2010). En pacientes con enfermedad de Alzheimer existe evidencia de la degeneración de neuronas serotoninérgicas en el DRN y MnR, asociado con pérdida de receptores a 5-HT en terminales eferentes (Rodríguez, J. J., Noristani, H. N. et al. 2012; Xu, Y., Yan, J. et al. 2012).

Estudios con tallo cerebral de personas suicidas indican que el contenido tisular de 5-HT y el metabolito 5-HIAA en el DRN y MnR se encuentran elevados a comparación de sujetos control. Esto sugiere que la síntesis de 5-HT en estos núcleos es mayor en sujetos que cometen suicidio. Por otra parte, el recambio de 5-HT es menor en el tallo cerebral de sujetos suicidas, mientras que en la corteza prefrontal de estos mismos sujetos se observaron niveles similares de 5-HT y 5-HIAA, independientemente de la edad. En resumen, en sujetos suicidas existe mayor síntesis de 5-HT y menor recambio de 5-HT en los núcleos del DRN y MnR (Bach, H., Huang, Y. Y. et al. 2014). El estudio morfométrico del DRN de sujetos que cometieron suicidio indica aumento en el área y mayor densidad neuronal del DRN, con disminución en el tamaño de las neuronas serotoninérgicas. Sin embargo, en el mismo estudio, los cambios observados en tejido de pacientes con depresión mayor se asociaron con la disminución del área del DRN, sin diferencias en la densidad o tamaño neuronal (Matthews, P. R. and Harrison, P. J. 2012).

El aumento de la síntesis de 5-HT en el tallo cerebral de los sujetos suicidas podría deberse a un decremento de la unión y/o funcionalidad del receptor 5-HT_{1A}. Al respecto, hay estudios en tejido postmortem en los que se evaluó la unión de agonistas al autorreceptor 5-HT_{1A} en los núcleos del raqué humano en diferentes condiciones (Tabla 2). Hay estudios que indican disminución en la unión al autorreceptor 5-HT_{1A} en el raqué dorsal de sujetos que cometieron suicidio, algunos de ellos con depresión mayor (Arango, V., Underwood, M. D. et al. 2001; Boldrini, M., Underwood, M. D. et al. 2008). Por el contrario, hay evidencias que sugieren que, en sujetos con depresión y que cometieron suicidio, la unión al receptor 5-HT_{1A} se encuentra aumentada en la totalidad de los núcleos del raqué (Dillon, K. A., Gross-Isseroff, R. et al. 1991a; Stockmeier, C. A., Shapiro, L. A. et al. 1998). Las discordancias pueden deberse al tamaño pequeño de las muestras, lo que impide homogeneizar conclusiones respecto a los cambios del receptor 5-HT_{1A}, probablemente debido a que no se consideró que la edad de los sujetos pudiera ser un factor importante.

Otra condición importante no estudiada aún es que la edad puede influir en la capacidad de activación de la proteína G_i acoplada en el DRN, donde mantiene un rol como autorreceptor y sitio fundamental para la regulación serotoninérgica cerebral.

Tabla 2. Estudios de unión al receptor 5-HT_{1A} en núcleos del raqué humano mediante autorradiografía in vitro

Estudio	Muestras*	IPM	Área cerebral	Ligando marcado	Exposición	Resultados
Pazos et al. 1987	n= 24 SENP 4H:10M Edad: 64.4 (15.3) (Rango 26-92) años	2-13.4 h	Varios Raqué: n=4	a) [³ H]5-HT (26.2 Ci/mmol; 2 nM) b) [³ H]8-OH-DPAT (116 Ci/mmol; 2 nM)	¿?60 días	5-HT ₁ : N. Raqué dorsal: ↑(Intenso; Lateral>central)
Dillon et al. 1991	n=28 SENP a) Suicidio (n=14: Depresión 5) 9H:5M Edad: 42.87±18.53 (Rango: 14-72) años b) Controles (n=14) 9H:5M Edad: 43.24±21.06 (Rango 15-81) años	a) Suicidio: 22.99±10.39 (Rango 5-45) h b) Control: 26.31±11.25 (Rango 8-48) h	Cortes a nivel: - Prefrontal derecho - Frontoparietal derecho - Tallo cerebral	[³ H]8-OH-DPAT (171, 178, 179 o 187 Ci/mmol; 2 nM)	10 sem	- [³ H]8-OH-DPAT: ↑↑Raqué (n=5, DRN); - Efectos del alcohol (n=4; 52.5±17.4 años): ↓[³ H]8-OH-DPAT - Efectos del suicidio: Sin cambios en la unión a [³ H]8-OH-DPAT. Correlación negativa entre edad y unión específica en hombres.
Stockmeier et al. 1996	n=7 SENP 7H Edad: 55±3 (Promedio ± SEM; Rango 46-67) años	20±2 (Promedio ± SEM; Rango 11-24) h Alm: 1 año	Tallo cerebral	a) [³ H]8-OH-DPAT (135.5 o 147.2 Ci/mmol; 2 nM) b) [³ H]Paroxetine (16.6 o 22 Ci/mmol; 0.35-0.38 nM)	a) 1 sem b) 12 sem	[³ H]8-OH-DPAT: ↑Unión en DRN. Nivel 1: DRv>DRif>DRd. Nivel 2: DRvl>DRv>DRif>DRd Nivel 3: DRv>DRif>DRd Nivel 4: DRif>DRc Edad: Correlación negativa con densidad del receptor en DRv (Nivel 2; $\rho=-0.780$, $p=0.039$). PMI: Correlación negativa con densidad del receptor en DRd, DRv y DRif (Nivel 3; $\rho=-0.905$, -0.896 y -0.875 , $p\leq 0.022$).
Stockmeier et al. 1998	n=20 a) MDD Suicidas (n=10) H8:2M Edad: 50±6 (SEM; Rango 25-83) años b) Controles (n=10) H9:1M Edad: 52±5 (SEM; Rango 27-82) años	a) Suicidio: 18±2 (SEM; rango 5-21) h b) Controles: 17±2 (SEM; rango 6-26) h	Tallo cerebral	[³ H]8-OH-DPAT (154.3 Ci/mmol; 2 nM)	1 sem	↑Densidad de unión en: DRN (5-30%), DRd (11-34%), DRvl (11-13%), en pacientes con MDD suicidas.

Arango et al. 2001	n=20 SENP a) Suicidio (n=10) H6:4M Edad: 44±18 años b) Controles (n=10) H6:4M Edad: 45±19 años	a) Suicidio: 15.8 ±7.7 h b) Controles: 12.7 ± 4.9 h	Tallo cerebral (mesencéfalo: DRN y MRN)	a) [³ H]8-OH-DPAT (125-162 Ci/mmol; 2 nM) b) [³ H]CN-IMI (80 Ci/mmol; 0.4 nM)	a) 2 sem b) 4 sem	Volumen de distribución de 5-HT _{1A} : DRN ↓Suicidas (40%; C: 42.2 ±20.0 vs. S: 25.3 ± 13.7 mm ³ , t=3.47, df=9, p=.007) MRN ↓Suicidas (23%; C: 27.5 ± 10.7 vs. S: 21.1 ± 10.4 mm ³ , t=2.48, df=9, p=.038) Concentración de 5-HT _{1A} : Sin diferencias Capacidad de unión a 5-HT _{1A} : DRN ↓43% en suicidas (C: 3006.4 ± 1516.3 vs. S: 1703.6 ± 1005.1, t=3.82, df=9, p=.004) MRN ↓34% en suicidas (C: 1254.8 ± 501.3 vs. S: 824.7 ± 489.2, t=2.56, df=9, p=.031) Concentración de unión de SERT sin diferencias
Boldrini et al. 2008	n=20 a) MDD Suicidas (n=10) H6:4M Edad: 44.1±7.7 años b) Controles sanos (n=10) H6:4M Edad: 45.4±18.6 años	a) Suicidio: 15.8 ±2.2 h b) Controles: 12.7 ± 4.9 h	Tallo cerebral (mesencéfalo: DRN y MRN)	[³ H]8-OH-DPAT (125-162 Ci/mmol; 2 nM)	2 sem	La unión de 5-HT _{1A} varía a lo largo del eje rostrocaudal del DRN (F _(df=5,14) = 11.08; p = 0.0002). ↑Unión a nivel -3 mm en MDD, mujeres con MDD (-3 mm, F _(df=1,6) = 19.60; p = 0.0044) y hombres con MDD (-3 mm; F _(df=1,10) = 23.69; p = 0.0007) ↑Unión en mujeres control ↓Área de unión en MDD vs controles ↓Área de unión en mujeres con MDD en todos los niveles rostrocaudales ↓Capacidad de unión en MDD (especialmente mujeres) Sin efectos por pH cerebral, IPM o edad.

*H:M (Relación Hombres:Mujeres), Edad: (media ± Desviación estándar) o Error estándar de la media (S.E.M.) cuando se indique; SENP: Sin enfermedad neuropsiquiátrica; IPM: Intervalo postmortem; Alm: Almacenamiento; DRN: Núcleo del raquí dorsal; DRd: núcleo del raquí dorsal; DRv: núcleo del raquí ventral; DRif: núcleo del raquí interfascicular; DRvl: núcleo del raquí ventrolateral; DRc: núcleo del raquí caudal; MRN: Núcleo del raquí medial; SERT: Transportador de serotonina; MDD: Depresión mayor;

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El sistema serotoninérgico está involucrado en un gran número de funciones complejas del sistema nervioso central. El núcleo del raquí dorsal (DRN) es el principal centro productor de serotonina para todo el cerebro. La actividad de las neuronas serotoninérgicas en las distintas subdivisiones del DRN está regulada, principalmente, por el autorreceptor 5-HT_{1A}, del cual se conoce la localización, expresión proteica del receptor, la capacidad de unión a fármacos y los mecanismos de señalización intracelular. Se sabe que, con la edad, hay decremento en la unión del autorreceptor 5-HT_{1A} en el DRN (Stockmeier, C. A., Shapiro, L. A. *et al.* 1998). Podemos esperar que la actividad de la proteína G_i disminuya con la edad a la par de la disminución en la unión al receptor 5-HT_{1A} en el DRN. Además, tras la disminución del efecto inhibitor inducido por el autorreceptor 5HT_{1A}, se espera que la concentración tisular de 5-HT y su metabolito 5-HIAA aumenten en el DRN. Sin embargo, no existen estudios que apoyen esta hipótesis.

Por otra parte, se sabe que los cambios fisiológicos asociados con la edad pueden estar relacionados con el aumento en el riesgo o susceptibilidad para desarrollar enfermedades neuropsiquiátricas, como la depresión. El sistema serotoninérgico ha sido implicado en estas alteraciones, sin embargo, los mecanismos exactos no han sido elucidados. Con este trabajo se pretende estudiar de manera integral los principales componentes del sistema serotoninérgico en el DRN para establecer si los cambios por la edad pueden influir en mayor comorbilidad de trastornos neuropsiquiátricos.

5.1. Pregunta de investigación

¿Existe correlación entre la edad de sujetos humanos con la unión al autorreceptor 5-HT_{1A}, la capacidad de activación de la proteína G_i acoplada al mismo y el recambio de 5-HT, en el núcleo del raquí dorsal?

6. JUSTIFICACIÓN

La evidencia científica indica que el sistema serotoninérgico se modifica respecto a la edad. En algunas personas, estos cambios en el sistema serotoninérgico se han asociado con el desarrollo de trastornos neuropsiquiátricos. Se sabe que los niveles totales de 5-HT disminuyen con la edad, en relación con neurodegeneración y disminución en la producción de 5-HT en los núcleos del raquí. En el DRN, con la edad, el autorreceptor 5-HT_{1A}, componente importante del sistema serotoninérgico, también disminuye, tanto su densidad y, probablemente, su funcionalidad. Se sabe que la densidad y unión al receptor 5-HT_{1A} en los núcleos del raquí varía en el eje rostrocaudal del tallo cerebral, tanto en tejido de sujetos sanos como en tejido de sujetos con depresión y suicidio. Por otro lado, existen resultados contradictorios respecto a los factores (como edad) que influyen en la capacidad de unión al autorreceptor 5-HT_{1A} y su capacidad de activación de la proteína G acoplada.

Hasta la fecha no existe un estudio que describa, de manera integral, los cambios asociados con la edad en la transmisión serotoninérgica del raquí dorsal humano. Esta estructura del tallo cerebral representa el principal centro neuronal serotoninérgico, participando con el mayor porcentaje de síntesis de 5-HT y, mediante sus proyecciones eferentes, está involucrado en una gran cantidad de procesos fisiológicos y patológicos. En el DRN, el autorreceptor 5-HT_{1A} es el principal modulador de la síntesis y liberación de 5-HT al resto del sistema nervioso.

Pocos estudios han analizado la capacidad de activación de la proteína G_i acoplada al autorreceptor 5-HT_{1A}, con agonistas específicos (Serrats, J., Artigas, F. *et al.* 2004), y ninguno ha estudiado la correlación entre la densidad del autorreceptor, la activación de la proteína G_i acoplada y los cambios en el contenido tisular de 5-HT con la edad. Por otro lado, se sabe que los

niveles de 5-HT en el DRN dependen de la activación del receptor 5-HT_{1A}. La relación entre la 5-HT y su metabolito, 5-HIAA, es un indicador importante del metabolismo de la neurona serotoninérgica. Sin embargo, se desconoce la relación entre el recambio de 5-HT y el estado funcional del receptor 5-HT_{1A} en el DRN y los cambios asociados con la edad.

En el laboratorio se cuenta con amplia experiencia en el empleo de procedimientos de unión a receptores y otras técnicas farmacológicas, tanto en animales de experimentación (Meneses, A., Manuel-Apolinar, L. et al. 2004; Rocha, L., Ackermann, R. F. et al. 1996; Rocha, L., Arida, R. M. et al. 2006; Tellez, R., Rocha, L. et al. 2010; Zavala-Tecuapetla, C. and Rocha, L. 2013), como en tejido humano postquirúrgico y postmortem (Banuelos-Cabrera, I., Cuellar-Herrera, M. et al. 2016; Cuellar-Herrera, M., Velasco, A. L. et al. 2014; Martinez-Levy, G. A., Rocha, L. et al. 2016; Rocha, L., Alonso-Vanegas, M. et al. 2015; Rocha, L., Alonso-Vanegas, M. et al. 2012; Rocha, L., Lorigados-Pedre, L. et al. 2007; Rocha, L., Orozco-Suarez, S. et al. 2009b)

La habilidad y precisión para identificar el autorreceptor 5-HT_{1A} en los distintos subnúcleos del raquí y su capacidad de activación de cascadas transduccionales ampliará el conocimiento de los mecanismos de transducción de señal asociados con el autorreceptor 5-HT_{1A} y la regulación de sus funciones en tejido humano, así como sobre el rol fisiológico de este receptor y su involucro en procesos asociados con la edad. El estudio integral del sistema serotoninérgico, mediante la correlación del estado funcional del autorreceptor 5-HT_{1A} con el recambio de 5-HT y los cambios asociados con la edad, pueden favorecer el desarrollo de hipótesis y blancos terapéuticos orientados al tratamiento y/o prevención de enfermedades neuropsiquiátricas cuya prevalencia correlaciona con la edad y la disfunción del sistema serotoninérgico cerebral.

7. HIPÓTESIS

En el núcleo dorsal del raquí de sujetos humanos sin trastornos cerebrales aparentes, a mayor edad existe menor capacidad de activación de la proteína G_i acoplada al autorreceptor 5-HT_{1A}, asociado con mayor contenido tisular y menor metabolismo de 5-HT en dicha estructura.

8. OBJETIVOS

8.1. Objetivo general

Evaluar los cambios con la edad en la neurotransmisión serotoninérgica a nivel de la unión al autorreceptor 5-HT_{1A}, la capacidad para activar su proteína G_i asociada, así como el recambio de 5-HT en el núcleo del raquí dorsal de sujetos humanos sin trastornos cerebrales aparentes.

8.2. Objetivos específicos

Evaluar en los diferentes subnúcleos del raquí dorsal humano, en relación rostro-caudal:

- La unión de un agonista específico al autorreceptor 5-HT_{1A}.
- La capacidad de activación de la proteína G_i acoplada al autorreceptor 5-HT_{1A}.
- El recambio de 5-HT a través de la evaluación del contenido tisular de 5-HT y su metabolito 5-HIAA en el DRN.
- Correlacionar los resultados obtenidos con la edad de los sujetos.

9. METODOLOGÍA

9.1. Diseño del estudio

Estudio postmortem, observacional, descriptivo y transversal.

9.2. Sujetos de estudio

Se obtuvieron tallos cerebrales completos de 15 sujetos (5 mujeres, 10 hombres) con causas de muertes variables y no atribuibles a enfermedades neurológicas. El intervalo postmortem, definido como el tiempo desde el momento del fallecimiento hasta la obtención del tejido, no superó las 24 horas (14.93 ± 2.9 horas). El tejido se obtuvo a través del Servicio Médico Forense (SEMEFO) de la Ciudad de México.

9.3. Manipulación del tejido

El tejido cerebral se transportó a 4°C al laboratorio de Farmacobiología del CINVESTAV, donde se almacenó a -70°C hasta su procesamiento. El tiempo de almacenamiento promedio (obtención de la muestra hasta su corte) fue de 40.73 ± 1.9 meses. Se obtuvieron cortes axiales, seriados y en paralelo del tallo cerebral con grosor de $20\ \mu\text{m}$, usando un criostato (Leica 1510).

Se obtuvieron 120 secciones de manera seriada y paralela, las cuales se montaron por descongelación en laminillas de vidrio previamente cubiertas con gelatina. Estas secciones se utilizaron para los experimentos de autorradiografía e histología. Posteriormente se procedió a obtener 44 secciones seriadas (1.08 g de tejido aproximadamente) que se almacenaron juntas en un tubo Eppendorf y se utilizaron para evaluar el contenido tisular de 5-HT y 5-HIAA. Este procedimiento se repitió (recolección de 120 secciones para autorradiografía y 44 para contenido tisular), hasta concluir el corte de todo el tallo cerebral. Las laminillas se mantuvieron a -20°C y los tubos Eppendorf con tejido se almacenaron a -70°C hasta su procesamiento.

El DRN se subdividió en cuatro niveles en relación rostro-caudal, para analizar los subnúcleos específicos, de acuerdo con los estudios de Baker y colaboradores (Baker, K. G., Halliday, G. M., Hornung, J. P. et al. 1991; Baker, K. G., Halliday, G. M. et al. 1990; Stockmeier, C. A., Shapiro, L. A. et al. 1996). El nivel 1 correspondió al inicio del núcleo oculomotor o 2.75 mm rostrales al istmo; el nivel 2 se encontró a 1.7 mm rostral al istmo; el nivel 3 se ubicó a 0.5 mm rostral al istmo; y el nivel 4 se definió a nivel del istmo. Debido a las diferencias en el corte transversal entre el tallo cerebral y el encéfalo, en 8 casos no fue posible analizar el contenido tisular del nivel 1 (Figura 2).

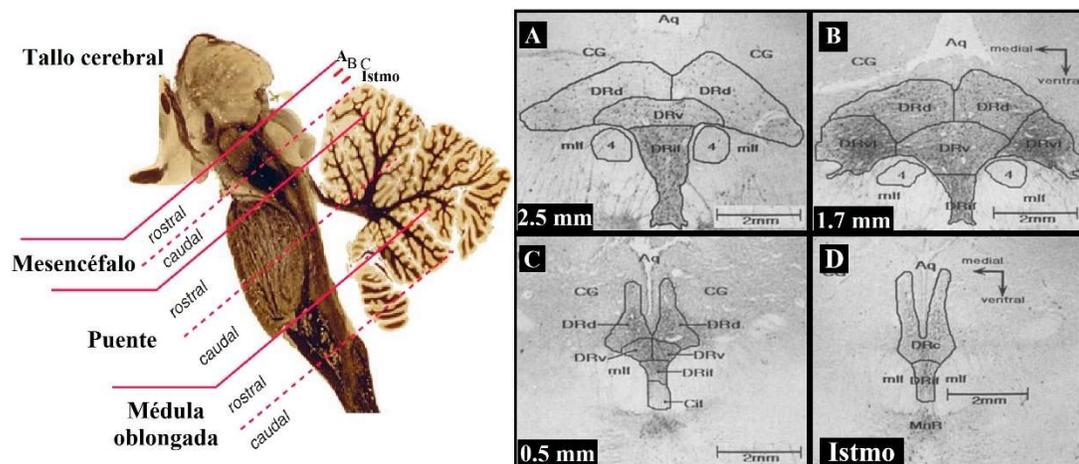


Figura 2. Localización neuroanatómica de núcleo del rafé dorsal humano. El DRN se subdividió en cuatro niveles en relación rostro-caudal, para analizar los subnúcleos específicos, de acuerdo con los estudios de Baker *et al.* (1990, 1991) y Stockmeier *et al.* (1996). A) El nivel 1 correspondió al inicio del núcleo oculomotor o 2.75 mm rostrales al istmo; B) el nivel 2 se encontró a 1.7 mm rostrales al istmo; C) el nivel 3 se ubicó a 0.5 mm rostrales al istmo; y D) el nivel 4 fue localizado a nivel del istmo. DRd: subdivisión dorsal; DRv: subdivisión ventral; DRvl: subdivisión ventrolateral; DRil: subdivisión interfascicular; DRc: subdivisión caudal; Aq: Acueducto; CG: Sustancia gris periacueductal; mlf: fascículo longitudinal medial; 4: núcleo troclear. Modificado de: Nofre J. *The Human Brain in Photographs and Diagrams*, 4th Ed, 2013; Stockmeier *et al.* (1996). *Brain Res* 727 (1-2): 1-12.

9.4. Procedimientos experimentales

9.4.1. Histología

Para caracterizar y delimitar los subnúcleos del DRN se utilizaron cortes seriados del tallo cerebral. El análisis microscópico del DRN con histología convencional permite evidenciar la morfología neuronal y asegurar la presencia de neuronas en los cortes subsecuentes para los métodos autoradiográficos. Un juego de secciones cerebrales por caso se procesó de acuerdo con el método de Klüver-Barrera (Klüver, H. and Barrera, E. 1953) modificado y contrateñido con tinción de Nissl. El método de Klüver-Barrera utiliza una tinción de ftalocianina de cobre (Luxol fast blue) para resaltar las fibras de mielina. La contratinción con Nissl (Cresyl violeta), permite teñir los núcleos (soma) neuronal, otorgando mejor definición morfológica (Suvarna, K. S., Layton, C. *et al.* 2018).

Las secciones tisulares se fijaron con alcohol al 70% durante 12 horas. Posteriormente, se tiñeron con Luxol-Fast Blue durante 2 horas a 60°C, se enjuagaron con alcohol al 95% y agua destilada, finalmente se utilizó carbonato de litio al 0.05% durante 30 segundos para la diferenciación y, finalmente, se lavaron con etanol al 70%. Una vez completada la diferenciación, se colocaron las laminillas en agua destilada y se contrastaron con tinción especial de Nissl durante 10 min. Se deshidrataron en alcoholes crecientes (95% y 100%), seguido de xilol. Todas las laminillas se montaron con resina sintética Entellan (Merck) y se cubrieron con portaobjetos.

La identificación de los núcleos del rafé dorsal se evaluó con microscopio óptico y se comparó con atlas citoarquitecturales del tallo cerebral humano (Olszewski, J. and Baxter, D. 1954). La localización neuroanatómica por este método sirvió como referencia para establecer los límites de los núcleos en las laminillas de autorradiografía cuantitativa y funcional. Además, se identificaron cuatro niveles del DRN, de acuerdo con Baker *et al.* (1990, 1991) y Stockmeier *et al.* (1996). El objetivo fue evaluar la unión al autorreceptor 5-HT_{1A}, la estimulación de la proteína Gi acoplada y los niveles tisulares de 5-HT y 5-HIAA en cada subnúcleo, de acuerdo al nivel y por nivel total (la suma de los valores encontrados en todos los subnúcleos pertenecientes al nivel evaluado).

9.4.2. Autorradiografía cuantitativa

La autorradiografía es un método para estudiar la unión a receptores, la cual permite la visualización microscópica de la unión de un ligando a un receptor de interés. Se utiliza un ligando marcado, usualmente con tritio ($[^3\text{H}]$), el cual se incuba junto con rebanadas del tejido a analizar, para posteriormente obtener un autorradiograma, con el cual se puede localizar y cuantificar la unión al receptor de interés en una región anatómica pequeña (Kar, S. and Hawkes, C. 2007; Kuhar, M. J., De Souza, E. B. et al. 1986). Con otros métodos, como la inmunohistoquímica, se puede evaluar la expresión proteica de los receptores. Sin embargo, la autorradiografía permite la evaluación de la capacidad de unión de un ligando al receptor, y no sólo su presencia en el tejido. De cada serie de cortes tisulares, se tomaron cuatro laminillas representativas de cada nivel del DRN. Las condiciones experimentales se resumen en la Tabla 2 (Figura 3).

Un juego de secciones tisulares se lavó inicialmente con solución amortiguadora (Tris HCl 170 nM; pH 7.6) a temperatura ambiente durante 30 min, con el propósito de eliminar los ligandos endógenos. Posteriormente, las secciones se incubaron durante 60 minutos en solución amortiguadora con un ligando específico marcado con tritio ($[^3\text{H}]8\text{-OH-DPAT}$; 2nM; actividad específica 124 Ci/mmol) para el receptor 5-HT_{1A}. La incubación finalizó con dos lavados consecutivos, de cinco minutos cada uno, en solución amortiguadora. Finalmente, las secciones se enjuagaron en agua bidestilada durante 3 segundos a 4°C y se secaron con aire frío. Otro juego de secciones paralelas se procesó igual que lo antes descrito, excepto que se adicionó 8-OH-DPAT (1µM), un ligando no marcado, durante la incubación con $[^3\text{H}]8\text{-OH-DPAT}$. La unión obtenida de este segundo ensayo en presencia del ligando no marcado se consideró la unión inespecífica. Los valores de unión específica se obtuvieron de la diferencia entre la unión inespecífica y la unión obtenida con $[^3\text{H}]8\text{-OH-DPAT}$.

Las laminillas se colocaron en magazines de plomo para autorradiografía junto con estándares de tritio (ART-123A), y se pusieron en contacto con una película sensible a tritio (Kodak MR) a temperatura ambiente para su adecuada exposición, bajo condiciones de oscuridad durante 4 meses. Pasado este periodo, las películas se revelaron con revelador Kodak D19 y fijador rápido a temperatura ambiente. La densidad óptica (OD) de los núcleos del rafé se determinó mediante un analizador de imágenes (Bioquant, Life Science, versión 12.2.6, USA). Para cada núcleo evaluado se obtuvo un promedio de 10 lecturas de la OD por muestra. Las OD de los estándares se utilizaron para determinar los valores de radiactividad del tejido mediante una curva estándar y los valores se convirtieron en fentomolas por miligramo de proteína (fmol/mg de proteína), con base en la actividad específica del ligando marcado (124 Ci/mmol), su concentración y el grosor de la rebanada (20 µm).

Tabla 3. Condiciones para los experimentos de autorradiografía cuantitativa

Receptor	Ligando	Sol. amortiguadora pH 7.6	Incubación (TA)	Exposición (TA)	Ligando inespecífico	Referencia
5-HT _{1A}	$[^3\text{H}]8\text{-OH-DPAT}$ (2 nM; Actividad específica: 124 Ci/mmol)	Tris HCl (170 mM) Tris Base (3.3 g/l) CaCl ₂ (4 mM) Ácido ascórbico (0.01%)	60 min	8 semanas	8-OH-DPAT (1 µM)	Pazos et al., 1987

TA, Temperatura ambiente.

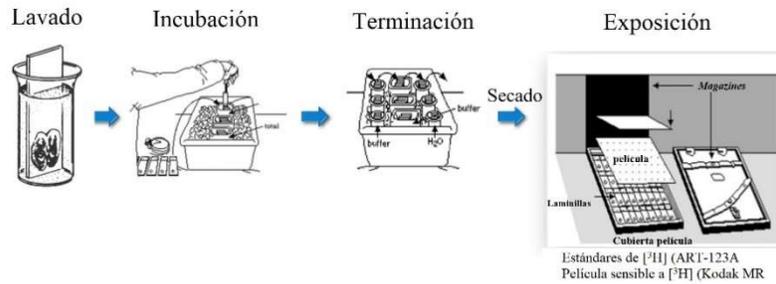


Figura 3. Secuencia de autorradiografía cuantitativa para receptores

9.4.3. Autorradiografía funcional

El ensayo de unión a [^{35}S]GTP γ S evalúa el nivel de activación de la proteína $G_{i/o}$ estímulo por un agonista al receptor acoplado a las proteínas $G_{i/o}$ en cuestión. Las proteínas G son complejos heterotriméricos constituidos por subunidades G_α monoméricas y subunidades $G_{\beta\gamma}$ diméricas (Oldham, W. M. and Hamm, H. E. 2008). Tras la activación de un receptor por su agonista, la subunidad G_α monomérica se disocia de la subunidad $G_{\beta\gamma}$. Posteriormente se realiza el intercambio de GDP por GTP, con lo cual se desencadena la vía de señalización intracelular a través de segundos mensajeros (Harrison, C. and Traynor, J. R. 2003; Oldham, W. M. and Hamm, H. E. 2008). El procedimiento experimental consiste en marcar a la proteína G_i en su estado activo por medio de la adición de [^{35}S]GTP γ S. El enlace γ -tiofosfato del [^{35}S]GTP γ S impide la hidrólisis de la subunidad G_α por la GTPasa, por lo que las subunidades G_α se acumulan al no poder formar el complejo ternario con las subunidades $G_{\beta\gamma}$. Finalmente, se mide la radioactividad emitida por el isótopo radiactivo [^{35}S] incorporado (Harrison, C. and Traynor, J. R. 2003) (Ilustración 4). En este estudio, el ensayo se realizó con algunas modificaciones, de acuerdo con lo descrito previamente (Sim, L. J. and Childers, S. R. 1997; Sim, L. J., Selley, D. E. *et al.* 1995).

Por cada muestra de tejido, se utilizaron cuatro series de secciones tisulares paralelas. Las condiciones experimentales se muestran en la figura 5. Inicialmente, las secciones se lavaron en solución amortiguadora a 25°C durante 10 min, seguido por una incubación en solución amortiguadora adicionada con GDP (2 mM) durante 15 min a 25°C. Posteriormente, cada juego de secciones se procesó en uno de los siguientes ensayos:

- Ensayo de unión basal. Evalúa la unión del ligando marcado [^{35}S]GTP γ S en presencia de altas concentraciones de GDP y ausencia del agonista. Las secciones se incuban en solución amortiguadora adicionada con GDP (2mM) y [^{35}S]GTP γ S (0.04 mM).
- Ensayo de estimulación. Evalúa la actividad del receptor inducida por un agonista, al cuantificar el porcentaje de [^{35}S]GTP γ S liberada tras la estimulación del receptor. El proceso es igual que el ensayo de unión basal, excepto que se adiciona 8-OH-DPAT (100 μM) como agonista específico para estimular al autorreceptor 5-HT $_{1A}$.
- Ensayo para bloquear la estimulación. Evalúa la especificidad de la activación de la proteína G asociada al receptor de interés, al bloquear la estimulación de éste con un antagonista específico. El ensayo es igual que el de estimulación, excepto se le agrega WAY100635 (10 μM) como antagonista específico del autorreceptor 5-HT $_{1A}$, con el propósito de evitar la estimulación del agonista.

- d) Ensayo de unión inespecífica. Evalúa la unión de un ligando a otras moléculas diferentes al receptor. Se realizó de acuerdo con lo descrito para el ensayo de la unión basal, pero con la adición de GTP γ S (10 μ M) no marcado con el propósito de evitar el marcaje de la proteína G $_i$ por el [35 S]GTP γ S.

Al final de cada ensayo, las secciones tisulares se lavaron dos veces en solución amortiguadora durante 2 min cada uno, a 4°C y, finalmente, en agua desionizada a 4°C durante 3 s. Las laminillas se secaron con aire seco y se expusieron en magazines de plomo para autorradiografía funcional junto con estándares de [14 C] (American Radiolabeled Chemicals, Inc.). Las secciones se expusieron a películas sensibles a [35 S] (Kodak MR), a temperatura ambiente y bajo condiciones de oscuridad durante 2 semanas. Pasado este periodo, las películas se revelaron con revelador Kodak D19 y fijador rápido a temperatura ambiente. El análisis densitométrico se realizó según lo descrito para la autorradiografía cuantitativa y los valores se convirtieron en nanocuries (nCu) de [35 S] por miligramo de proteína (nCu/mg proteína). La estimulación neta de la unión del [35 S]GTP γ S tras la estimulación del receptor 5-HT $_{1A}$ se calculó con la diferencia entre el valor la unión basal y la unión obtenida en presencia del agonista.

Evaluación del autorreceptor 5-HT $_{1A}$

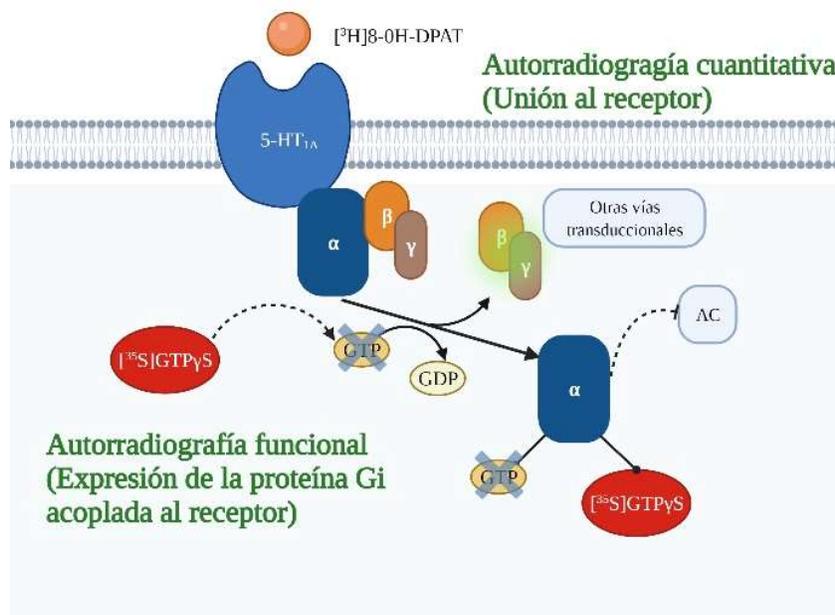


Figura 4. Evaluación del autorreceptor 5-HT $_{1A}$ por autorradiografía

9.4.4. Cuantificación tisular 5-HT y 5-HIAA

Mediante la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) se puede realizar la cuantificación del contenido tisular de monoaminas en un homogeneizado. Este procedimiento consiste en la separación de los compuestos de una muestra mediante interacciones físicas y químicas entre las moléculas. La concentración de catecolaminas presentes en la muestra es calculada a partir de los cambios en el voltaje producidos por la oxidación de estos utilizando una curva previamente calculada (Peat, M. A. and Gibb, J. W. 1983)

En condiciones fisiológicas, los niveles cerebrales de 5-HT y el metabolito 5-HIAA se mantienen constantes, debido a que la síntesis y degradación de estas moléculas son iguales. Se

denomina recambio a la cantidad de un neurotransmisor que es metabolizado o transportado fuera de una célula (Korf, J. 1981). La tasa de recambio de 5-HT es un indicador confiable de la actividad neuronal (Neff, N. H. and Tozer, T. N. 1968). Para determinar la correlación entre la estimulación de la proteína Gi acoplada al autorreceptor 5-HT_{1A} y el recambio de 5-HT, se cuantificaron los niveles tisulares del neurotransmisor y su metabolito.

9.4.4.1. Extracción de aminas

Para la evaluación del contenido tisular de 5-HT y su metabolito 5-HIAA, se utilizó el método descrito por Peat MA, *et al.* (1983). El tejido se identificó de acuerdo con el nivel de sección y se homogeneizó inmediatamente en 90 μ L de ácido perclórico (HClO₄; 0.1 M) en frío. Los homogenados se centrifugaron a 13,000 rpm durante 15 minutos a 4°C con una microcentrífuga Beckman. El sobrenadante se filtró con filtros Nalgene de 0.45 μ m (4 mm; F2604) y se resuspendió en ácido perclórico (0.1 M) en proporción 1:250. La pastilla restante se usó para determinar la cantidad de proteínas, de acuerdo con el método descrito por Bradford, *et al.* (1976).

El contenido tisular de 5-HT y 5-HIAA se analizó mediante un procedimiento de detección fluorométrica por cromatografía líquida de alta resolución (High-performance liquid chromatography, HPLC, por sus siglas en inglés), de acuerdo con el método descrito por Clinckers *et al.* (2004). Brevemente, la fase móvil consistió en buffer de acetonitrilo (95:5; pH 3.35) compuesto por: acetato de sodio (25 mM), EDTA disódico (0.01 mM), ácido cítrico (25 mM) y ácido 1-Octanesulfónico (1 mM). Los homogenados se inyectaron de forma directa en el automuesteador. Se utilizó un sistema de fase reversa consistente en una columna C18 (3 μ m) de 2.1 x 50 mm Atlantis (Waters®, U.S.) acoplado a una pre-columna (Nova-Pack, Waters®) por la cual se hizo pasar la fase móvil descrita anteriormente, utilizando bombas (Waters 515) a velocidad de flujo de 0.35 mL/min. La detección de 5-HT y 5-HIAA se realizó mediante un detector electroquímico (Waters® modelo 2465, U.S.) a un potencial de 450 mV y temperatura de 30°C, cuantificándose por medición del área de cada pico comparada contra la curva estándar. La curva estándar se realizó utilizando estándar de 5-HT (Sigma H9523, PM 212.68) y 5-HIAA (Sigma H8876, PM 191.18). Se preparó una solución de 100 μ M de cada compuesto, al pesarse 0.5 mg de cada estándar y solubilizarlos en HClO₄ 0.1M (1 mL). Posteriormente se realizó una dilución 1:100 (con 990 μ L HClO₄ 0.1 M), y, finalmente, diluciones para obtener concentraciones de estándar de 500, 250, 100 y 50 nM. La cuantificación se realiza por la medición del área bajo la curva (AUC, en inglés) al interpolar los datos obtenidos en la curva de calibración de los estándares. La curva de calibración de los estándares se obtiene mediante una regresión lineal.

9.4.4.2. Extracción de proteínas

Con el propósito de expresar el contenido tisular en mg de proteína, se procedió a determinar los niveles proteicos de todas las muestras analizadas. Brevemente, el método de Bradford consiste en la cuantificación de la unión de un colorante (Azul de Coomassie G-250) a la proteína, comparando esta unión con la de diferentes cantidades de una proteína estándar (Albúmina de Suero Bovino). La cuantificación se hace midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro, a 595 nm, y graficando la absorbancia contra la concentración de proteínas, obteniendo una curva de calibración de la proteína estándar. Con esta curva de calibración, se puede interpolar la concentración de proteínas en una muestra al medir su absorbancia a 595 nm.

Para realizar este procedimiento se prepararon alícuotas disolviendo 5 μ L de la pastilla suspendida en 45 μ L de agua Milli-Q. A esta dilución se le añadieron 250 μ L del reactivo de

Bradford y se cubrió durante 10 minutos antes de realizar la detección de absorbancia (Kruger, N. J. 1994). A partir de la curva estándar se calculó la concentración de proteína presente en las muestras a partir de la absorbancia obtenida para cada una.

9.4.4.3. Recambio de 5-HT

El recambio de 5-HT representa la diferencia entre la cantidad del neurotransmisor que se transporta y libera en el espacio sináptico y la cantidad que se sintetiza para reabastecer la reserva celular (Curzon, G. 1981). El recambio de 5-HT representa la razón entre la cantidad de 5-HIAA y 5-HT (5-HIAA:5-HT). Los valores altos representan mayor metabolismo de 5-HT, mientras que valores por debajo de la unidad traducen menor metabolismo de 5-HT. La disponibilidad de 5-HT para el metabolismo intraneuronal depende del balance entre la liberación de 5-HT y la entrada de 5-HT al axoplasma por recaptura del neurotransmisor del espacio sináptico (Barton, D. A., Esler, M. D. et al. 2008).

9.4.5. Análisis estadístico

9.4.5.1. Tamaño de la muestra

Muestra a conveniencia. Se obtuvieron, de forma consecutiva, tallos cerebrales de 15 sujetos.

9.4.5.2. Análisis estadístico

Los valores se expresan en Media \pm Error estándar de la media. El coeficiente de correlación de Pearson se calculó para establecer correlaciones significativas ($p < 0.05$) entre la densidad autorradiográfica (unión al receptor 5-HT_{1A} y estimulación de la proteína G_i) por subnúcleos, niveles neuroanatómicos, concentración tisular de 5-HT y 5-HIAA y la edad. Se utilizaron los programas estadísticos STATA v. 12 (StataCorp LLC, College Station, TX, USA) y Prism (GraphPad Software, Inc. CA, USA).

10. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente estudio cuenta con la aprobación del comité de bioética del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) y del Servicio Médico Forense (SEMEOF) de la Ciudad de México. Los experimentos en tejidos de seres humanos se realizaron de acuerdo con lo establecido en los artículos comprendidos en el Reglamento de la Ley General de Salud en materia de control sanitario de la disposición de órganos, tejidos y cadáveres de seres humanos, y del Reglamento de la Ley General en Salud en Materia de Investigación para la Salud.

11. RESULTADOS

11.1. Muestras

Se recolectaron 15 muestras de tejido de tallo cerebral, 5 muestras de mujeres y 10 de hombres, con edad promedio de 33.6 (DE 16.2; rango 12-73) años. La principal causa de muerte fue por asfixia ($n=5$; 33.3%). El intervalo postmortem promedio entre la muerte y la disección del tejido y congelación fue de 14.93 (DE 2.9) horas (Tabla 2). Se realizaron cortes del tejido y se montaron en laminillas para los procedimientos experimentales: 1) identificación histológica del DRN; 2) autorradiografía cuantitativa; 3) autorradiografía funcional, y 4) cuantificación tisular de 5-HT y 5-HIAA.

Tabla 4. Casos analizados

Caso	Edad	Género	IP	Causa de muerte
S2	29	M	18	Policontusión
S3	30	M	12-14	Lesión por proyectil de arma de fuego
S4	40	M	12-14	Lesión por proyectil de arma de fuego
S7	45	M	18	Asfixia
S8	73	M	15	Complicaciones de Diabetes Mellitus
S9	33	F	12	Traumatismo torácico
S10	36	M	12	Lesión por proyectil de arma de fuego
S11	12	F	14	Asfixia
S14	45	F	10	Desconocido
S16	25	M	18	Herida punzocortante en tórax
S17	55	M	14-16	Trauma tóraco-abdominal
S18	22	F	12	Trauma tóraco-abdominal
S19	17	F	18	Asfixia
S20	16	M	18	Asfixia
S21	16	M	18	Asfixia

M: Masculino; F: Femenino; IP: Intervalo postmortem en horas.

11.2. Histología

El DRN se observó en cuatro niveles rostro caudales de acuerdo con lo descrito por Baker et al. (1990, 1991; Figura 2). El nivel 1 se localizó en el límite rostral del núcleo troclear (IV) o 2.75 mm rostral a la unión entre el mesencéfalo y puente (istmo). El nivel 2 se definió hasta 1.7 mm rostral al istmo, el nivel 3 se localizó a 0.5 mm rostral al istmo y el nivel 4 se estudió a nivel del istmo (Baker, K. G., Halliday, G. M., Hornung, J. P. *et al.* 1991; Baker, K. G., Halliday, G. M. *et al.* 1990).

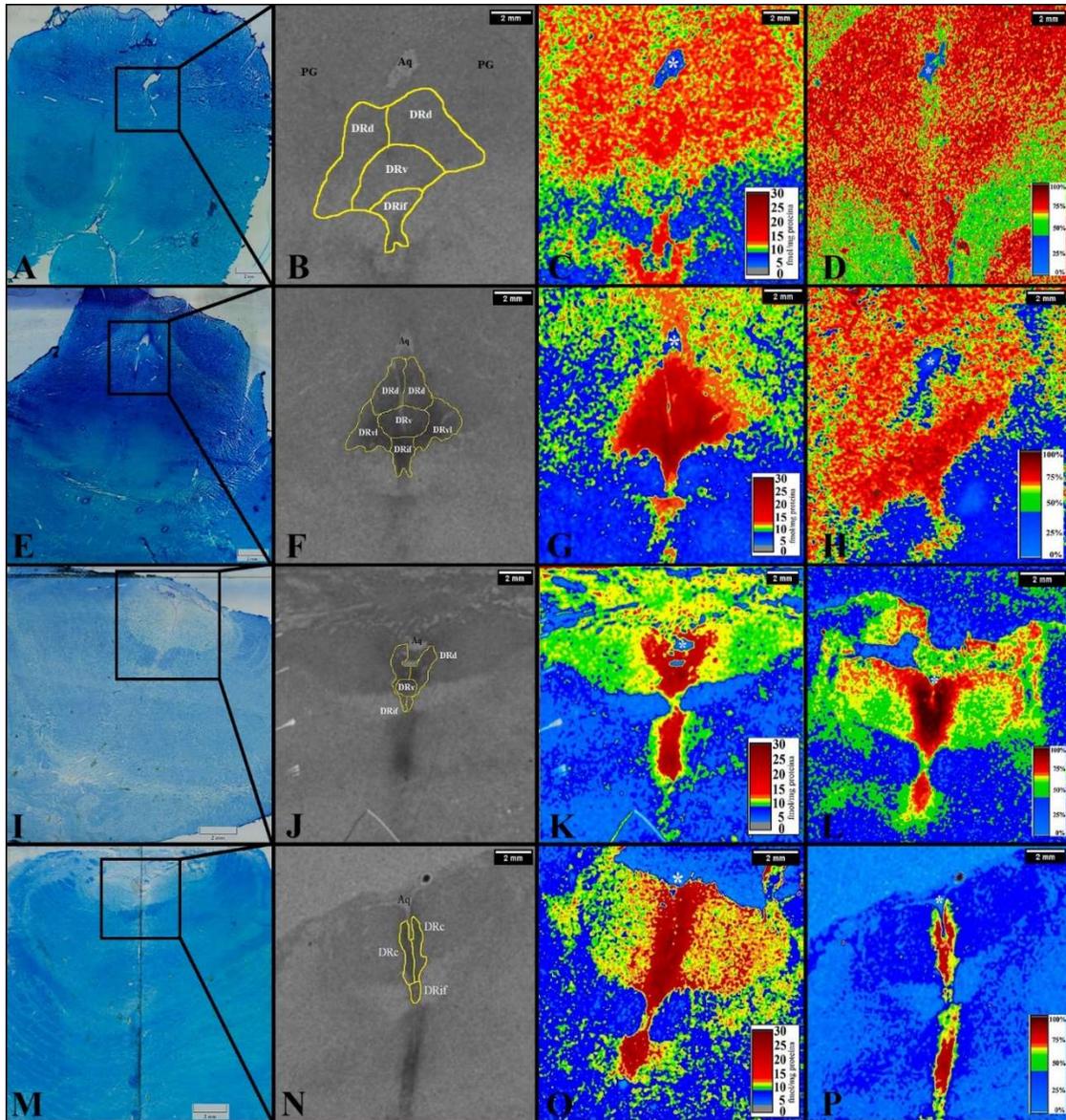


Figura 5. Núcleo del rafé dorsal humano, localización neuroanatómica y expresión del autorreceptor 5-HT_{1A} y la proteína G_i acoplada. El DRN se realizó con cortes histológicos teñidos con Luxol-Fast Blue (A, E, I, M). La unión al autorreceptor 5-HT_{1A} por autorradiografía cuantitativa sirvió para delinear los subnúcleos DRd, DRv, DRl, DRf y DRc (B, F, J, N). Los autorradiogramas en los que se evaluó la unión al autorreceptor 5-HT_{1A} (C, G, K, O) y la estimulación de [³⁵S]GTPγS (D, H, L, P) se modificaron a escala colorimétrica usando ImageJ (NIH, EU). El nivel 1 se localizó en el límite rostral del núcleo troclear (IV) hasta 1 mm rostral a la unión entre el mesencéfalo y puente (istmo; A-D). 2) El nivel 2 se definió hasta 1.7 mm rostral al istmo (E-H). 3) El nivel 3 se localizó a 0.5 mm rostral al istmo (I-L). 4) El nivel 4 se observó a nivel del istmo (M-Q). Aq y *: Acueducto; PG: Sustancia gris periacueductal.

Corroboramos la subdivisión anatómica del DRN, de acuerdo con lo descrito previamente por Baker et al. 1990. Esta subdivisión sirvió como referencia y correspondió con la unión al receptor 5-HT_{1A}, demostrada por autorradiografía cuantitativa. Con esto, confirmamos que existe correlación espacial entre la división neuroanatómica del DRN y la presencia de receptores 5-HT_{1A} en las neuronas que pertenecen a sus subnúcleos.

11.3. Los niveles caudales del DRN presentan mayor unión al autorreceptor 5-HT_{1A}

Los niveles de unión a [³H]8-OH-DPAT se analizaron por subnúcleo y a lo largo del eje rostrocaudal del DRN (Tabla 5; Figura 6). Los subnúcleos mostraron tendencia a presentar mayores valores de unión al autorreceptor 5-HT_{1A} en los niveles caudales del DRN. El DRd, el subnúcleo

con mayor volumen reportado en la literatura (Baker, K. G., Halliday, G. M. *et al.* 1990), mostró niveles crecientes en la unión al autorreceptor: en el nivel 1 fue de 35.0 ± 7.9 fmol/mg de proteína, el menor valor encontrado, en el nivel 2 fue de 91.3 ± 15.9 fmol/mg de proteína, y alcanzó la máxima unión en el nivel 3 (158.5 ± 44.9 fmol/mg de proteína).

El subnúcleo DRv mostró tendencia similar de unión al autorreceptor 5-HT_{1A} en los niveles caudales del DRN. En el nivel 1 encontramos el menor valor expresado (42.5 ± 12.3 fmol/mg de proteína), mientras que aumentó a 134.3 ± 23.8 fmol/mg de proteína en el nivel 2 y el valor máximo se obtuvo en el nivel 3 (173.5 ± 28.6 fmol/mg de proteína).

El subnúcleo DRvl, presente únicamente en el nivel 2, mostró la mayor densidad de unión al autorreceptor 5-HT_{1A} (194.1 ± 33.5 fmol/mg de proteína) de todos los subnúcleos del DRN.

El subnúcleo DRif se observó en todos los niveles evaluados y mostró la menor unión al autorreceptor 5-HT_{1A} en el nivel 1 (37.8 ± 11.5 fmol/mg de proteína). Los niveles de unión fueron aumentando, de tal forma que el nivel 2 mostró 162.5 ± 30.5 fmol/mg de proteína y en el nivel 3 alcanzó la mayor unión (166.1 ± 32.1 fmol/mg de proteína). La unión al autorreceptor disminuyó levemente en el nivel 4 (111.2 ± 22.9 fmol/mg de proteína).

El subnúcleo DRc se localizó en el nivel más caudal del DRN, mostrando densidad de unión al autorreceptor 5-HT_{1A} de 153.6 ± 41.4 fmol/mg de proteína.

Al analizar por nivel total, la unión al autorreceptor 5-HT_{1A} fue menor en el nivel 1 (38.45 ± 8.33 fmol/mg de proteína) a comparación de los niveles 2 (151.3 ± 21.4 fmol/mg de proteína; ANOVA $p < 0.001$), nivel 3 (158 ± 27.2 fmol/mg de proteína; $p < 0.0001$) y nivel 4 (136.9 ± 32.6 fmol/mg de proteína; $p = 0.2$). La unión al autorreceptor 5-HT_{1A} entre los niveles 2 y 3 no fue significativa ($p = 0.19$). Por otro lado, la unión al autorreceptor 5-HT_{1A} fue mayor en el nivel 2 y 3 a comparación del nivel 4 ($p < 0.0001$ y $p = 0.0055$, respectivamente).

En resumen, a partir del nivel 2 del DRN se observó mayor unión de [³H]8-OH-DPAT al autorreceptor 5-HT_{1A}. Los niveles 2 y 3 mostraron la mayor unión al autorreceptor.

Tabla 5. Unión de [³H]8-OH-DPAT al receptor 5-HT_{1A} en subnúcleos del rafe dorsal del mesencéfalo y puente humano

Subnúcleo	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4
DRd	35.0 ± 7.9	91.3 ± 15.9	158.5 ± 44.9	NP
DRv	42.5 ± 12.3	134.3 ± 23.8	173.5 ± 28.6	NP
DRvl	NP	194.1 ± 33.5	NP	NP
DRif	37.8 ± 11.5	162.5 ± 30.5	166.1 ± 32.1	111.2 ± 22.9
DRc	NP	NP	NP	153.6 ± 41.4

Valores en Media \pm EEM, unidades en fmol/mg de proteína; NP: No presente en el nivel.

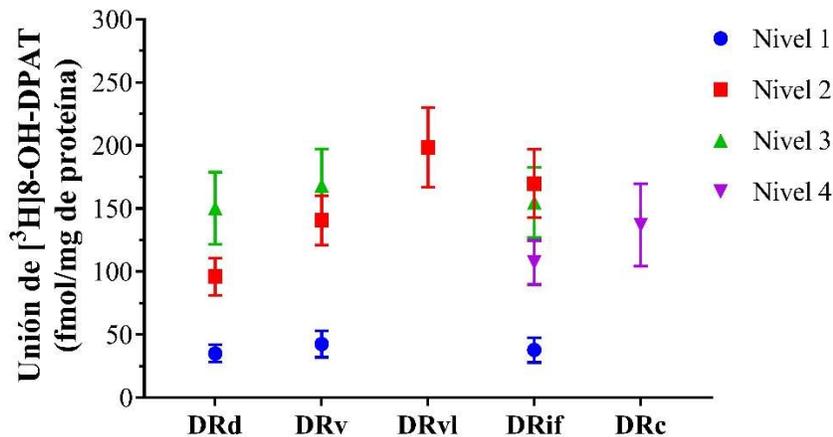


Figura 6. Unión al receptor 5-HT_{1A} en el núcleo dorsal humano. La unión al autorreceptor se presenta por subnúcleo y su expresión por nivel analizado del DRN. Los niveles 2 y 3 mostraron mayor unión al autorreceptor 5-HT_{1A}.

11.4. Los niveles caudales del DRN muestran mayor estimulación de la proteína G_i acoplada al autorreceptor 5-HT_{1A}

Se evaluó el porcentaje de estimulación de la proteína G_i acoplada al autorreceptor 5-HT_{1A} mediante el ensayo de unión a [³⁵S]GTPγS. Se encontró aumento no significativo en los niveles caudales del DRN a presentar mayor porcentaje de estimulación de la proteína G_i acoplada al autorreceptor 5-HT_{1A} (Nivel 3 y 4; Tabla 4; Figura 4).

El DRd mostró niveles crecientes en el porcentaje de estimulación de la proteína G_i acoplada al autorreceptor 5-HT_{1A}: en el nivel 1 fue de 45.0% ±12.9%, en el nivel 2 fue de 54.5% ±10.1%, y alcanzó el máximo porcentaje de estimulación en el nivel 3 (64.3% ±17.9%).

El porcentaje de estimulación de la proteína G_i acoplada al autorreceptor 5-HT_{1A} del subnúcleo DRv mostró mayor valor respecto a los niveles caudales del DRN. En el nivel 1 presentó el menor porcentaje de estimulación (44.7% ±10.2%). Observamos aumento al 50.4% ±8.6% en el nivel 2 y el valor máximo se obtuvo en el nivel 3 (60.2% ±16.9%).

El subnúcleo DRvl, a pesar de presentar la mayor unión al autorreceptor 5-HT_{1A}, mostró porcentaje de estimulación de la proteína G_i del 57.1% ±9.4%.

Por otro lado, el subnúcleo DRif presentó menor estimulación de la proteína G_i acoplada al autorreceptor 5-HT_{1A} en el nivel 1 (43.8% ±10.2%). En este subnúcleo, el porcentaje de estimulación de la proteína G_i acoplada al autorreceptor 5-HT_{1A} fue aumentando en los niveles caudales, de tal forma que el nivel 2 mostró estimulación del 52.9% ±9.2%, en el nivel 3 fue del 60.7% ±14.6%, y el mayor porcentaje de estimulación se demostró en el nivel 4 (72.4% ±14.9%).

El subnúcleo DRc mostró alto porcentaje de estimulación de la proteína G_i acoplada al autorreceptor 5-HT_{1A} (70.1% ±15.2%). De interés resulta que los valores de unión al autorreceptor 5-HT_{1A} y el porcentaje de estimulación de la proteína G_i acoplada al autorreceptor 5-HT_{1A} fueron mayores en los niveles caudales del DRN. Sin embargo, no encontramos correlación estadística entre ambos parámetros en ningún subnúcleo del DRN. A pesar de esto, podemos inferir que, bajo estas condiciones experimentales, un porcentaje considerable de autorreceptores 5-HT_{1A} mantienen acoplamiento adecuado con la proteína G_i asociada.

En resumen, a partir del nivel 2, se observó mayor estimulación de la proteína G_i acoplada al autorreceptor 5-HT_{1A} en el DRN. Esto traduce acoplamiento adecuado de la proteína G_i al receptor y funcionamiento estable de la neurotransmisión serotoninérgica.

Tabla 6. Porcentaje de proteínas G_i activas y acopladas al autorreceptor 5-HT_{1A} en subnúcleos del raqué dorsal del mesencéfalo y puente humano

Subnúcleo	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4
DRd	45.0±12.9	54.5±10.1	64.3±17.9	NP
DRv	44.7±10.2	50.4±8.6	60.2±16.9	NP
DRvl	NP	57.1±9.4	NP	NP
DRif	43.8±10.2	52.9±9.2	60.7±14.6	72.4±14.9
DRc	NP	NP	NP	70.1±15.2

Valores en Media ± EEM, unidades en porcentaje (%) de estimulación; NP: No presente en el nivel.

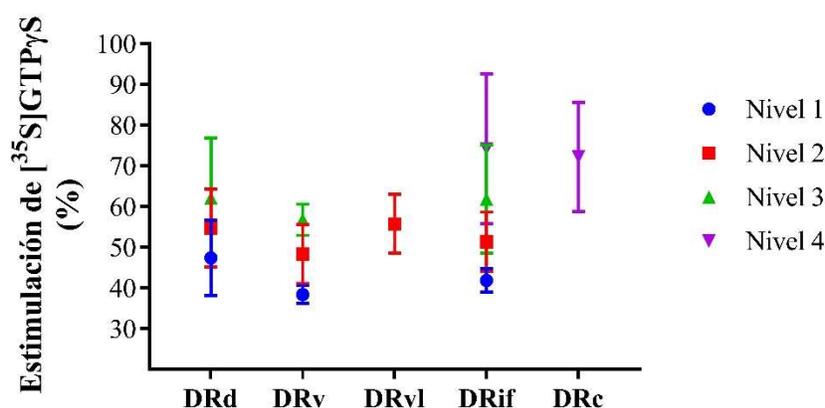


Figura 7. Estimulación de la proteína G_i acoplada al receptor 5-HT_{1A} en el raqué dorsal humano. En los niveles caudales de cada subnúcleo se observó mayor estimulación de la proteína G_i .

11.5. La concentración tisular de 5-HT y 5-HIAA y el recambio de 5-HT son similares a lo largo del DRN

Los niveles tisulares de 5-HT y su metabolito 5-HIAA fueron cuantificados con HPLC por nivel analizado del DRN, en 14 de los 15 casos incluidos en el estudio (Tabla 5). En ocho casos no fue posible analizar los niveles de 5-HT y 5-HIAA en el nivel 1 del DRN (8/14; 42.9%; Ver métodos).

La concentración de 5-HT y 5-HIAA en todos los niveles fue constante y similar. La concentración tisular promedio de 5-HT fue de 28.6 nM y del metabolito 5-HIAA de 17.5 nM en el total del DRN. El recambio de 5-HT (5-HIAA/5-HT) promedio fue de 0.614 nM (EEM: 0.002). Esto traduce menor metabolismo de 5-HT en el DRN.

En resumen, los niveles tisulares de 5-HT y 5-HIAA, así como el recambio de 5-HT se mantienen constantes a lo largo del DRN. Sin embargo, el nivel de recambio de 5-HT obtenido refleja menor metabolismo de 5-HT en el DRN.

Tabla 7. Concentración tisular de 5-HT y 5-HIAA por nivel analizado del raquí dorsal

	Nivel 1*	Nivel 2 ⁺	Nivel 3 ⁺	Nivel 4 ⁺
5-HT	28.6±0.1	28.7±0.2	28.6±0.1	28.5±0.1
5-HIAA	17.4±0.1	17.5±0.1	17.7±0.1	17.5±0.1
Recambio de 5-HT (5-HIAA/5-HT)	0.61±0.002	0.61±0.005	0.62±0.006	0.61±0.003

Media±EEM. Unidades en concentración nanomolar [nM]. *n=6; ⁺n=14.

11.6. La edad influye en la unión al autorreceptor 5-HT_{1A}, la estimulación de la proteína G_i acoplada al autorreceptor, la concentración y recambio de 5-HT a nivel del DRN

Se encontró relación directamente proporcional entre la edad de los individuos y la unión al autorreceptor 5-HT_{1A} en el subnúcleo DRif del DRN ($r = 0.5463$; $p = 0.043$; Tabla 6). En los demás subnúcleos no se encontró aumento proporcional en la unión al autorreceptor respecto a la edad.

La estimulación total de la proteína G_i fue mayor, a mayor edad, en el nivel 2 del DRN ($r = 0.6151$; $p = 0.015$; Tabla 8). Por otro lado, en cada uno de los subnúcleos del nivel 2 se encontró mayor estimulación de la proteína G_i conforme a mayor edad [DRvl ($r = 0.6958$; $p = 0.004$); DRd ($r = 0.5784$; $p = 0.024$); DRv ($r = 0.437$; $p = 0.024$); DRif ($r = 0.5388$; $p = 0.038$)]. Estos resultados indican que a mayor edad del sujeto existe mayor estimulación de la proteína G_i acoplada al receptor 5-HT_{1A} en todos los subnúcleos del nivel 2 del DRN.

El recambio de 5-HT en el nivel 2 del DRN mostró menor valor en relación con mayor edad ($r = -0.6376$; $p = 0.019$). Además, se encontró mayor concentración tisular de 5-HT total en el nivel 2 con el aumento de edad ($r = 0.7388$; $p = 0.003$). El resto de los niveles del DRN no mostraron cambios con la edad en los valores del recambio de 5-HT. Esto indica disminución en el metabolismo de 5-HT en el nivel 2 del DRN.

En conjunto, los resultados muestran diferencias relacionadas con la edad en el sistema serotoninérgico del DRN, a lo largo del eje rostro-caudal. Mientras que, a mayor edad, hay mayor unión al autorreceptor 5-HT_{1A} en subnúcleos caudales (DRif), la mayor estimulación de la proteína G_i acoplada al autorreceptor 5-HT_{1A} y el menor recambio de 5-HT se encuentran en el nivel 2. Por lo tanto, el recambio de 5-HT disminuye con la edad en el nivel medio-rostral del DRN (nivel 2), a pesar de la mayor estimulación, a mayor edad, de la proteína G_i acoplada al autorreceptor 5-HT_{1A}.

Tabla 8. Correlación entre edad de los sujetos de estudio y los diferentes parámetros evaluados (unión al autorreceptor 5-HT_{1A}, estimulación de la proteína G_i acoplada al autorreceptor 5-HT_{1A} y niveles tisulares de 5-HT y 5-HIAA) en el núcleo del raquí dorsal

Edad vs	Pearson <i>r</i>	<i>p</i>	n
<i>Unión al autorreceptor 5-HT_{1A}</i>			
DRd	-0.2286	0.413	15
DRv	-0.1336	0.635	15
DRvl	-0.2196	0.432	15
DRif	-0.1319	0.639	15
DRc	0.1588	0.572	15
Nivel 1	0.03685	0.896	15
Nivel 2	-0.1318	0.640	15
Nivel 3	-0.3812	0.161	15
Nivel 4	0.2953	0.285	15
DRif Nivel 4	0.5463	0.043	15
<i>Estimulación de [³⁵S]GTPγS</i>			
DRd	0.401	0.138	15
DRv	0.4326	0.107	15
DRvl	0.6958	0.004	15
DRif	0.3035	0.272	15
DRc	0.1983	0.479	15
Nivel 1	-0.1913	0.573	11
Nivel 2	0.6151	0.015	15
Nivel 3	0.1265	0.653	15
Nivel 4	0.2453	0.378	15
DRd Nivel 2	0.5784	0.024	15
DRv Nivel 2	0.437	0.024	15
DRvl Nivel 2	0.6958	0.004	15
DRif Nivel 2	0.5388	0.038	15
<i>Concentración tisular de aminas</i>			
5-HT	0.1501	0.609	14
5-HT Nivel 1	-0.1939	0.713	6
5-HT Nivel 2	0.7388	0.003	14
5-HT Nivel 3	-0.125	0.670	14
5-HT Nivel 4	-0.4353	0.120	14
5-HIAA	0.177	0.545	14
5-HIAA Nivel 1	-0.6418	0.170	6
5-HIAA Nivel 2	-0.08322	0.777	14
5-HIAA Nivel 3	0.02688	0.927	14
5-HIAA Nivel 4	0.2267	0.436	14
Metabolismo de 5-HT	0.0317	0.914	14
Metabolismo de 5-HT Nivel 1	-0.5592	0.249	6
Metabolismo de 5-HT Nivel 2	-0.6376	0.019	14
Metabolismo de 5-HT Nivel 3	0.08402	0.775	14
Metabolismo de 5-HT Nivel 4	0.4008	0.156	14

12. DISCUSIÓN

En este estudio de tejido cerebral humano, analizamos el sistema serotoninérgico del DRN, de acuerdo con la división neuroanatómica por subnúcleos y niveles. Se evaluó la capacidad de unión al receptor 5-HT_{1A} por un agonista específico marcado ([³H]8-OH-DPAT), la capacidad de estimulación de la proteína G_i acoplada al receptor 5-HT_{1A}, el recambio de 5-HT y la influencia de la edad en estos parámetros.

El DRN es un núcleo importante del rafe, implicado en funciones vitales y con proyecciones eferentes distribuidas en gran parte del cerebro (Hornung, J.-P. 2003). Es el principal centro serotoninérgico y su función está regulada, en gran medida, por el autorreceptor 5-HT_{1A} y los niveles de 5-HT (Polter, A. M. and Li, X. 2010; Sprouse, J. S. and Aghajanian, G. K. 1987; Stamford, J. A., Davidson, C. et al. 2000). Estudios previos han caracterizado la densidad de unión al receptor 5-HT_{1A} en los subnúcleos del DRN humano (Arango, V., Underwood, M. D. et al. 2001; Benwell, M. E., Balfour, D. J. et al. 1990; Biegon, A., Kargman, S. et al. 1986; Dillon, K. A., Gross-Isseroff, R. et al. 1991a; Hall, H., Lundkvist, C. et al. 1997; Hoyer, D., Pazos, A. et al. 1986; Marazziti, D., Marracci, S. et al. 1994; Palego, L., Giromella, A. et al. 1999; Paterson, D. S., Belliveau, R. A. et al. 2004; Pazos, A., Probst, A. et al. 1987a) y demostrado que la densidad del receptor varía de acuerdo al nivel y subnúcleo analizado (Pazos, A., Probst, A. et al. 1987a; Stockmeier, C. A., Shapiro, L. A. et al. 1996). Sin embargo, ninguno ha estudiado el sistema serotoninérgico (densidad de unión, capacidad de activación de la proteína G_i y niveles tisulares de 5-HT/5-HIAA) en el DRN y su correlación con la edad.

Se encontró que la edad influye de manera positiva en la unión al receptor 5-HT_{1A} en los niveles caudales del DRN. Por otra parte, la estimulación de la proteína G_i acoplada al autorreceptor es mayor en el nivel medio rostral (nivel 2), conforme incrementa la edad. Esto último se asoció con mayor nivel de 5-HT y menor recambio de 5-HT en este nivel.

Bajo estas condiciones experimentales, el intervalo postmortem no influyó en la unión al receptor 5-HT_{1A}. Esto indica que el tejido utilizado está en buenas condiciones y los resultados son confiables. Por otro lado, el intervalo postmortem modificó la estimulación de la proteína G_i en el subnúcleo DR_c, el subnúcleo más caudal, sin afectar el porcentaje de activación de la proteína G_i en el resto del DRN (ver más adelante).

12.1. Existe mayor unión al autorreceptor 5-HT_{1A} en los niveles caudales del DRN

Este estudio confirma la distribución subregional del receptor 5-HT_{1A} humano, demostrada anteriormente a lo largo del eje rostrocaudal del DRN (Hornung, J.-P. 2012). Encontramos diferencias significativas en la densidad de unión al receptor 5-HT_{1A} entre subnúcleos y niveles analizados. En los niveles anatómicos analizados, los valores de densidad de unión en el nivel 1 fueron significativamente menores a comparación de niveles caudales, mientras que el nivel 3 presentó la mayor densidad de unión total al receptor. En el estudio de Stockmeier et al (1996), el nivel 1 (aproximadamente 2.75 mm rostral al istmo), mostró la menor densidad de unión al receptor 5-HT_{1A}, mientras que el nivel 2 (1.75 mm rostral al istmo, aproximadamente) mostró la mayor densidad de unión total (Stockmeier, C. A., Shapiro, L. A. et al. 1996). Las diferencias respecto a nuestros resultados pueden deberse a la definición de límites citoarquitectónicos entre subnúcleos. En nuestro estudio analizamos los cortes por histología con el método de Klüver-Barrera contrastado con Nissl, mientras que Stockmeier et al (1996) utilizaron inmunohistoquímica contra TrpOH, para definir los grupos neuronales. Estudios previos han demostrado buena correlación neuroanatómica entre la presencia de neuronas serotoninérgicas (evaluadas con inmunohistoquímica para PH8 y/o TrpOH) y la densidad del receptor 5-HT_{1A}. Se ha descrito mayor proporción de neuronas serotoninérgicas en niveles

caudales del DRN, medido por morfometría e inmunohistoquímica para PH8 (Matthews, P. R. and Harrison, P. J. 2012). En contraste, otros autores han demostrado que la mayor cantidad de neuronas serotoninérgicas se encuentra en el DRd (61% del total de neuronas del DRN, 28% del número total de neuronas serotoninérgicas) (Hornung, J.-P. 2012). En nuestro estudio, no realizamos inmunohistoquímica para evidenciar neuronas serotoninérgicas, y está bien descrito que la población neuronal en el DRN es heterogénea (Baker, K. G., Halliday, G. M., Hornung, J. P. et al. 1991), con coexistencia de somas neuronales no serotoninérgicos (Kiyasova, V., Bonnavion, P. et al. 2013), lo que pudo influir en la delimitación entre subnúcleos por histoquímica convencional.

Por otro lado, la mayor expresión para el autorreceptor 5-HT_{1A}, cuantificada por autorradiografía, se localizó en el subnúcleo DRvl. Este resultado concuerda con lo reportado anteriormente (Stockmeier, C. A., Shapiro, L. A. et al. 1998; Stockmeier, C. A., Shapiro, L. A. et al. 1996) y está en relación con la mayor presencia de neuronas serotoninérgicas (inmunoreactivas a TrpOH) por mm³ (Baker, K. G., Halliday, G. M., Hornung, J. P. et al. 1991; Baker, K. G., Halliday, G. M. et al. 1990). Los resultados reportados por Stockmeier et al (1998) respecto a la mayor unión al autorreceptor, medida por autorradiografía, en los niveles medios del DRN, definidos en su estudio como D y E, concuerdan con la presencia del subnúcleo DRvl en estos niveles. Mientras que en el estudio mencionado se reportan niveles de ~600 fmol/mg de proteína, la unión al receptor 5-HT_{1A} en nuestro estudio fue significativamente menor (198.6 fmol/mg de proteína). La única diferencia metodológica entre los estudios de unión al receptor 5-HT_{1A} y el nuestro, es la actividad específica del [³H]8-OH-DPAT utilizado. Nosotros utilizamos el agonista específico (8-OH-DPAT) con actividad específica de 124 Ci/mmol (PerkinElmer, MA, USA), mientras que Pazos et al (1987) utilizó el marcador con actividad específica de 116 Ci/mmol (Pazos, A., Probst, A. et al. 1987a), Dillon et al (1991) reportan diferentes valores de actividad específica (171, 178, 179 o 187 Ci/mmol) (Dillon, K. A., Gross-Isseroff, R. et al. 1991a), Stockmeier et al (1996) reportó el uso del ligando con actividad específica de 135.5 o 147.2 Ci/mmol (Stockmeier, C. A., Shapiro, L. A. et al. 1996), y, finalmente, Stockmeier et al (1998) utilizaron el marcador con actividad específica de 154.3 Ci/mmol (Stockmeier, C. A., Shapiro, L. A. et al. 1998). En otros estudios que evalúan el receptor 5-HT_{1A} en el DRN, no se reporta la actividad específica del agonista marcado con tritio. Teóricamente, el uso de un ligando radiactivo con actividad específica alta puede aumentar, a modo de error sistemático, la densidad de unión total a un receptor particular (Yamamura, H. L., Enna, S. J. et al. 1990). Los diferentes métodos de sustracción de la unión inespecífica pueden explicar los valores de la densidad autorradiográfica reportados en los estudios previos y en el nuestro.

12.2. Hay mayor estimulación de la proteína G_i acoplada al autorreceptor 5-HT_{1A} en los niveles caudales del DRN

Analizamos el marcaje de [³⁵S]GTPγS inducido por un agonista en cortes rostrocaudales del DRN humano por autorradiografía para visualizar la activación de la proteína G_i asociada (Harrison, C. and Traynor, J. R. 2003). Encontramos que todos los subnúcleos del nivel medio (nivel 2), muestran mayor porcentaje de estimulación de la proteína G_i acoplada al autorreceptor 5-HT_{1A} conforme aumenta la edad.

En tejido humano postmortem, la cuantificación autorradiográfica de la proteína G_{io} activada por el 8-OH-DPAT, agonista específico del receptor 5-HT_{1A}, representa una técnica efectiva para el estudio funcional y neuroanatómico en áreas pequeñas del sistema nervioso (Elliott, J. and Reynolds, G. P. 1999). Utilizamos el agonista específico 8-OH-DPAT, cuya unión al receptor 5-HT_{1A} ocurre únicamente durante la conformación de alta afinidad cuando el

receptor se encuentra acoplado a la proteína G_i . Este es el primer estudio en evaluar el estado funcional de la proteína G_i acoplada al receptor 5-HT_{1A} de forma integral por subnúcleo y nivel rostrocaudal del DRN humano.

Hasta la fecha, no hay estudios publicados que evalúen, en tejido humano postmortem, la estimulación de la proteína G_i asociada al autorreceptor 5-HT_{1A} en el DRN y sus cambios con la edad. Rodríguez-Puertas y cols. (2000) describieron la densidad neta de estimulación de la proteína G_i en el DRN con patrón anatómico similar a los ensayos de unión para el receptor 5-HT_{1A} en tejido humano (Rodríguez-Puertas, R., González-Maeso, J. *et al.* 2000). En nuestro estudio, además, se observó que el porcentaje de estimulación de la proteína G_i fue mayor en los niveles caudales del DRN, con patrón neuroanatómico similar al ensayo de unión al autorreceptor (Tabla 4; Fig 4). A pesar de esto, en ningún subnúcleo o nivel del DRN encontramos correlación entre la unión al autorreceptor 5-HT_{1A} y la estimulación de la proteína G_i asociada.

Se encontró disminución en la activación de la proteína G_i conforme incrementa el intervalo postmortem en el subnúcleo DRc ($r=-0.5876$; $p=0.021$). El resto de los subnúcleos no mostraron esta correlación. Un estudio en membranas corticales reportó que el tiempo de almacenamiento de las muestras se relaciona con la disminución en la unión basal a [³⁵S]GTP γ S (González-Maeso, J., Torre, I. *et al.* 2002). En este mismo estudio, los autores no encontraron correlación entre la estimulación neta de [³⁵S]GTP γ S inducida por 8-OH-DPAT y la edad. Los resultados del presente trabajo confirman que la actividad de la proteína G_i está conservada en el tejido humano postmortem, aún tras largos periodos de recolección postmortem en el laboratorio. Además, los valores de unión al autorreceptor 5-HT_{1A} no se vieron modificados por el intervalo postmortem, lo que refleja la viabilidad del tejido y la confiabilidad de los resultados.

En el presente estudio, analizamos tejido de sujetos sin enfermedad neuropsiquiátrica demostrada, sin embargo, desconocemos el historial clínico completo respecto al uso farmacológico de sustancias que afecten el sistema serotoninérgico. La historia clínica y personal de los sujetos de estudio respecto al consumo de fármacos pudo influir en la activación de la proteína G_i en el DRN. Estudios en modelos animales han demostrado que, posterior a la administración crónica de agonistas farmacológicos, la desensibilización somatodendrítica del autorreceptor 5-HT_{1A} reside en la disminución de la capacidad del receptor 5-HT_{1A} para activar a la proteína G_i en el DRN, efecto que puede corresponder con la internalización del receptor y desacoplamiento de la proteína G_i (Hensler, J. G. 2003; Hensler, J. and Durgam, H. 2001).

12.3. Niveles tisulares de 5-HT y 5-HIAA y recambio de 5-HT

La concentración tisular de 5-HT y el metabolito 5-HIAA fueron similares en todos los niveles analizados. Por otro lado, el recambio de 5-HT, índice del metabolismo del neurotransmisor, presentó niveles similares a lo largo del eje rostrocaudal del DRN, sin embargo, su valor total fue significativamente menor a lo reportado previamente. En tallo cerebral de sujetos control, Bach y colaboradores (2014) encontraron niveles de recambios de 5-HT de 15.3 pmol/mg de proteína (Bach, H., Huang, Y. Y. *et al.* 2014). Se sabe que el nivel de 5-HT o 5-HIAA disminuye en tallo cerebral de sujetos con depresión y suicidas. En el estudio no fue posible determinar la historia clínica de depresión o trastornos neuropsiquiátricos en los sujetos de estudio. Los niveles bajos del recambio de 5-HT pueden estar en relación con disminución en la degradación de la 5-HT en tallo.

12.4. Influencia de la edad en el sistema serotoninérgico del DRN

Estudios previos en tejido humano han descrito disminución en la expresión proteica, genética y los sitios de unión a los receptores 5-HT_{1A} en corteza cerebral (Arango, V.,

Underwood, M. D. et al. 1995; Arranz, B., Eriksson, A. et al. 1993; Burnet, P. W., Eastwood, S. L. et al. 1995; Marazziti, D., Marracci, S. et al. 1994; Pasqualetti, M., Nardi, I. et al. 1996). En pocos estudios se ha evaluado la influencia de la edad sobre el estado morfológico y funcional del receptor 5-HT_{1A} en el DRN (Dillon, K. A., Gross-Isseroff, R. et al. 1991a; Stockmeier, C. A., Shapiro, L. A. et al. 1996). En nuestro estudio, encontramos que, a mayor edad, existe mayor funcionalidad del receptor en los subnúcleos DRd, DRv, DRvl y DRif del nivel 2. Esto sugiere que los núcleos del nivel 2 muestran mayor activación del autorreceptor 5-HT_{1A}, lo que disminuye la síntesis de 5-HT y el tono serotoninérgico de estos núcleos. Esto es importante, ya que la mayoría de las neuronas serotoninérgicas del DRN se localizan en la porción rostral, constituida por los subnúcleos DRd, DRv, DRif y DRvl (Baker, K. G., Halliday, G. M. et al. 1990). Las proyecciones eferentes de estos núcleos se dirigen al telencéfalo, particularmente la corteza cerebral, neoestriado, amígdala, septum lateral y sustancia negra (Hornung, J.-P. 2012). La disminución en la producción de 5-HT, originada en estos subnúcleos del DRN, a mayor edad, puede estar relacionada con el desarrollo de trastornos neuropsiquiátricos como depresión y ansiedad, así como trastornos del sueño (Hornung, J.-P. 2003). Estos trastornos son más prevalentes en población adulta mayor.

Encontramos correlación directamente proporcional entre la unión al autorreceptor 5-HT_{1A} y mayor edad en el subnúcleo DRif. Esto contrasta con lo reportado por Stockmeier *et al.* (1996), quienes encontraron que, a mayor edad, disminuye la unión al receptor 5-HT_{1A} en el nivel 2 (Stockmeier, C. A., Shapiro, L. A. et al. 1996). Los autores discuten que el rango de edad de los sujetos incluidos en el análisis es corto (46-67 años) y no refleja los cambios asociados con la edad previamente descritos (Dillon, K. A., Gross-Isseroff, R. et al. 1991a; Middlemiss, D. N., Palmer, A. M. et al. 1986). Además, el tamaño de muestra es pequeño (n=7). En el presente estudio incluimos 15 muestras de sujetos sin enfermedad neurológica registrada, con rango de edad de 12-73 años (media 33.6). Sólo incluimos tejido de un individuo de 73 años, lo cual puede explicar la baja correlación entre los parámetros evaluados y la edad de los sujetos. El rango de edad y el tamaño de la muestra pueden ser factores que permitan evidenciar correlaciones con los niveles de unión y funcionalidad del receptor 5-HT.

Con la edad existe disminución de células serotoninérgicas sin cambio en la 5-HT total del DRN. Esto puede deberse a un decremento en la señalización del receptor 5-HT_{1A}, ya sea acoplamiento inadecuado o activación disminuida de la proteína G_i acoplada.

12.5. Implicaciones clínicas

Cabe recordar que las proyecciones neuronales del DRN corresponden a axones con varicosidades pequeñas que, en la corteza cerebral, se distribuyen a lo largo de todas las áreas y capas, con mayor concentración en la capa IV neocortical y en las áreas sensoriales primarias. Estas varicosidades no forman sinapsis verdaderas, sino representan un sistema de transmisión de volumen, que contribuye a la regulación de la actividad celular neocortical (Hornung, J.-P. 2003).

A comparación de los niveles 2, 3 y 4, el nivel 1 mostró menor estimulación de la proteína G_i acoplada al receptor 5-HT_{1A}. Las neuronas serotoninérgicas de estos subnúcleos (DRd, DRv y DRif) tienen proyecciones eferentes a estructuras telencefálicas involucradas en el control emocional e implicadas en trastornos de ansiedad y depresión, que incluyen el núcleo basolateral y central de la amígdala, el núcleo de la estría terminal y la corteza prefrontal ventromedial. Además, el subnúcleo DRd envía proyecciones colaterales a estructuras relacionadas que modulan el comportamiento de miedo y ansiedad, como el hipocampo y la corteza entorrinal (Paul, E. D. and Lowry, C. A. 2013). La corteza prefrontal y del cíngulo reciben una gran cantidad de fibras nerviosas provenientes del DRN (Puig, M. V. and Gullledge,

A. T. 2011). La menor estimulación de la proteína G_i acoplada al autorreceptor 5-HT_{1A} en el nivel 1 del DRN puede contribuir con alteraciones en la neurotransmisión del DRN a la corteza prefrontal, favoreciendo el desarrollo de trastornos neuropsiquiátricos.

Se sabe que la activación del autorreceptor 5-HT_{1A} en el DRN suprime la descarga neuronal, disminuyendo la liberación de 5-HT a nivel sináptico en las proyecciones telencefálicas (Polter, A. M. and Li, X. 2010), por lo que la disminución en la densidad de autorreceptores en el DRd, aunado a la capacidad disminuida para activar la vía de señalización intracelular, supone cambios en la liberación de 5-HT en todos los sitios de proyección serotoninérgica.

De igual manera, es relevante la mayor estimulación de la proteína G_i acoplada al autorreceptor 5-HT_{1A} en el nivel medio rostral del DRN. Los subnúcleos DRd, DRv, DRif y DRvl, que forman parte de este nivel anatómico, concentran la mayoría de las neuronas serotoninérgicas del DRN. La mayor activación del autorreceptor 5-HT_{1A} induce la disminución en la síntesis de 5-HT, así como su transporte y liberación axonal. Este efecto, que aumenta a mayor edad, puede favorecer el desarrollo de trastornos psicoemocionales, conductuales, de sueño y memoria. Se sabe que, en pacientes jóvenes con depresión mayor, hay disminución en la conectividad del DRN con la corteza prefrontal y del cíngulo (Anand, A., Jones, S. E. et al. 2019).

La depresión mayor es un trastorno que afecta a más de 300 millones de personas a nivel mundial (Smith, K. 2014). En México, se estima que 12.4% de la población general experimenta depresión, convirtiendo a la entidad en la cuarta causa de discapacidad y complicaciones médicas (ENSANUT 2012). Sin embargo, De los Santos y Carmona encontraron prevalencia de depresión (o algún síntoma depresivo) en el 74.3% de 5275 individuos con edad mayor a 60 años, encuestados por la Encuesta Nacional sobre Salud y Envejecimiento (ENASEM, 2012), (De los Santos, P. V. and Carmona Valdés, S. E. 2018). Esto contrasta con la prevalencia reportada previamente para la población mexicana adulta del 4.5% en 2005 (Belló, M., Puentes-Rosas, E. et al. 2005). La patogénesis y etiología de la depresión es multifactorial y compleja (Luppa, M., Sikorski, C. et al. 2012). Además, la comorbilidad con trastornos de ansiedad es alta. Las alteraciones en la regulación serotoninérgica, con la participación del autorreceptor 5HT_{1A} en el DRN favorece el desarrollo de ansiedad y depresión (Yohn, C. N., Gergues, M. M. et al. 2017).

13. CONCLUSIONES

A mayor edad, la estimulación de la proteína G_i acoplada al autorreceptor 5-HT_{1A} es mayor en el nivel medio-rostral del DRN, sin cambios en la unión al autorreceptor por un agonista específico. Así mismo, el metabolismo de 5-HT es menor en el nivel medio-rostral, sin alteraciones en los demás niveles. Estos cambios asociados con la edad en el sistema serotoninérgico pueden subyacer y favorecer el desarrollo de trastornos neuropsiquiátricos en la población de adultos mayores.

14. AGRADECIMIENTOS

Todos los recursos se obtuvieron de los fondos propios del laboratorio de Farmacobiología número 8 del CINVESTAV, a cargo de la Dra. Luisa L. Rocha Arrieta. El alumno recibió beca completa del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número 705422.

15. REFERENCIAS

- Akimova, *et al.* 2009. "The serotonin-1A receptor in anxiety disorders." *Biol Psychiatry* 66 (7): 627-35. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.03.012>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19423077>.
- Altieri, *et al.* 2013. "Rethinking 5-HT1A receptors: emerging modes of inhibitory feedback of relevance to emotion-related behavior." *ACS Chem Neurosci* 4 (1): 72-83. <https://doi.org/10.1021/cn3002174>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23336046>.
- Amenta, *et al.* 1991. "Neurotransmitters, neuroreceptors and aging." *Mech Ageing Dev* 61 (3): 249-73. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(91\)90059-9](https://doi.org/10.1016/0047-6374(91)90059-9).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1686627>.
- Anand, *et al.* 2019. "Resting State Functional Connectivity of Dorsal Raphe Nucleus and Ventral Tegmental Area in Medication-Free Young Adults With Major Depression." *Frontiers in Psychiatry* 9. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2018.00765>.
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpsy.2018.00765>.
- Andrade, *et al.* 2015. "5-HT1A Receptor-Mediated Autoinhibition and the Control of Serotonergic Cell Firing." *ACS Chem Neurosci* 6 (7): 1110-5. <https://doi.org/10.1021/acchemneuro.5b00034>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25913021>.
- Andrade, *et al.* 1986. "A G protein couples serotonin and GABAB receptors to the same channels in hippocampus." *Science* 234 (4781): 1261-5. <https://doi.org/10.1126/science.2430334>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2430334>.
- Arango, *et al.* 2001. "Serotonin 1A receptors, serotonin transporter binding and serotonin transporter mRNA expression in the brainstem of depressed suicide victims." *Neuropsychopharmacology* 25 (6): 892-903. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(01\)00310-4](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(01)00310-4). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11750182>.
- Arango, *et al.* 1995. "Localized alterations in pre- and postsynaptic serotonin binding sites in the ventrolateral prefrontal cortex of suicide victims." *Brain Res* 688 (1-2): 121-33. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00523-s](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00523-s).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8542298>.
- Arranz, *et al.* 1993. "Effect of aging in human cortical pre- and postsynaptic serotonin binding sites." *Brain Res* 620 (1): 163-6. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90286-v](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90286-v).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8402192>.
- Bach, *et al.* 2014. "Elevated serotonin and 5-HIAA in the brainstem and lower serotonin turnover in the prefrontal cortex of suicides." *Synapse* 68 (3): 127-30. <https://doi.org/10.1002/syn.21695>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23813499>.
- Baker, *et al.* 1991. "Cytoarchitecture of serotonin-synthesizing neurons in the pontine tegmentum of the human brain." *Synapse* 7 (4): 301-20. <https://doi.org/10.1002/syn.890070407>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2042112>.
- Baker, *et al.* 1991. "Distribution, morphology and number of monoamine-synthesizing and substance P-containing neurons in the human dorsal raphe nucleus." *Neuroscience* 42 (3): 757-75. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(91\)90043-n](https://doi.org/10.1016/0306-4522(91)90043-n).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1720227>.
- Baker, *et al.* 1990. "Cytoarchitecture of the human dorsal raphe nucleus." *J Comp Neurol* 301 (2): 147-61. <https://doi.org/10.1002/cne.903010202>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2262589>.

- Banerjee, *et al.* 2007. "The 5-HT_{1A} Receptor: A Signaling Hub Linked to Emotional Balance." In *Serotonin Receptors in Neurobiology*, edited by A. Chattopadhyay, In Frontiers in Neuroscience. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis
Copyright © 2007, Taylor & Francis Group, LLC.
- Banuelos-Cabrera, *et al.* 2016. "Pharmacoresistant temporal lobe epilepsy modifies histamine turnover and H₃ receptor function in the human hippocampus and temporal neocortex." *Epilepsia* 57 (4): e76-80. <https://doi.org/10.1111/epi.13329>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26915454>.
- Barnes, *et al.* 2021. "International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CX. Classification of Receptors for 5-hydroxytryptamine; Pharmacology and Function." *Pharmacol Rev* 73 (1): 310-520. <https://doi.org/10.1124/pr.118.015552>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33370241>.
- Barnes, *et al.* 1999. "A review of central 5-HT receptors and their function." *Neuropharmacology* 38 (8): 1083-1152. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(99\)00010-6](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(99)00010-6).
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0028390899000106>.
- Barton, *et al.* 2008. "Elevated Brain Serotonin Turnover in Patients With Depression: Effect of Genotype and Therapy." *Archives of General Psychiatry* 65 (1): 38-46.
<https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2007.11>.
<https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2007.11>.
- Baumann, *et al.* 2002. "Circumscribed numerical deficit of dorsal raphe neurons in mood disorders." *Psychol Med* 32 (1): 93-103. <https://doi.org/10.1017/s0033291701004822>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11883733>.
- Behzadi, *et al.* 1990. "Afferents to the median raphe nucleus of the rat: retrograde cholera toxin and wheat germ conjugated horseradish peroxidase tracing, and selective D-[³H]aspartate labelling of possible excitatory amino acid inputs." *Neuroscience* 37 (1): 77-100.
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90194-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90194-9).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2243599>.
- Belló, *et al.* 2005. "[Prevalence and diagnosis of depression in Mexico]." *Salud Publica Mex* 47 Suppl 1: S4-11.
- Benwell, *et al.* 1990. "Smoking-associated changes in the serotonergic systems of discrete regions of human brain." *Psychopharmacology (Berl)* 102 (1): 68-72.
<https://doi.org/10.1007/BF02245746>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1697418>.
- Berger, *et al.* 2009. "The Expanded Biology of Serotonin." *Annual Review of Medicine* 60 (1): 355-366. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.60.042307.110802>.
<https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.med.60.042307.110802>.
- Biegon, *et al.* 1986. "Characterization and localization of serotonin receptors in human brain postmortem." *Brain Res* 363 (1): 91-8. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)90661-x](https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)90661-x).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2936426>.
- Bjorvatn, *et al.* 1998. "Changes in sleep and wakefulness following 5-HT_{1A} ligands given systemically and locally in different brain regions." *Rev Neurosci* 9 (4): 265-73.
<https://doi.org/10.1515/revneuro.1998.9.4.265>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9886141>.
- Bockaert, *et al.* 2006. "Neuronal 5-HT metabotropic receptors: fine-tuning of their structure, signaling, and roles in synaptic modulation." *Cell Tissue Res* 326 (2): 553-72.
<https://doi.org/10.1007/s00441-006-0286-1>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16896947>.

- Bockaert, *et al.* 1987. "GTP binding proteins: a key role in cellular communication." *Biochimie* 69 (4): 329-38. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(87\)90024-1](https://doi.org/10.1016/0300-9084(87)90024-1).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3115313>.
- Boldrini, *et al.* 2008. "Serotonin-1A autoreceptor binding in the dorsal raphe nucleus of depressed suicides." *Journal of Psychiatric Research* 42 (6): 433-442. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jpsychires.2007.05.004>.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022395607000908>.
- Brunton. 2018. *Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*. 13th ed., edited by L.L. (ed.) Brunton, B.C Knollmann and R. Hillal-Dandan: McGraw Hill Medical.
- Bucht, *et al.* 1981. "Distribution of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid in human brain in relation to age, drug influence, agonal status and circadian variation." *J Neural Transm* 51 (3-4): 185-203. <https://doi.org/10.1007/BF01248951>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6169800>.
- Burnet, *et al.* 1995. "The distribution of 5-HT1A and 5-HT2A receptor mRNA in human brain." *Brain Res* 676 (1): 157-68. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00104-x](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00104-x).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7796165>.
- Carhart-Harris, *et al.* 2017. "Serotonin and brain function: a tale of two receptors." *J Psychopharmacol* 31 (9): 1091-1120. <https://doi.org/10.1177/0269881117725915>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28858536>.
- Carlsson, *et al.* 1980. "Biogenic amines in human brain in normal aging, senile dementia and chronic alcoholism." In *Ergot Compounds and Brain Function: Neuroendocrine and Neuropsychiatric Aspect*, edited by M. Goldstein, In *Advances in Biochemical Psychopharmacology*, 295-304. New York: Raven Press.
- Celada, *et al.* 2006. "Modulation of the Neuronal Activity and Neurotransmitter Release by 5-HT1A and 5-HT1B/1D Receptors." In *The Serotonin Receptors*, edited by Bryan L. Roth, 365-401. Totowa, NJ: Humana Press.
- Chazal, *et al.* 1987. "Serotonin-containing structures in the nucleus raphe dorsalis of the cat: an ultrastructural analysis of dendrites, presynaptic dendrites, and axon terminals." *J Comp Neurol* 259 (3): 317-29. <https://doi.org/10.1002/cne.902590302>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3294934>.
- Commons. 2008. "Evidence for topographically organized endogenous 5-HT-1A receptor-dependent feedback inhibition of the ascending serotonin system." *Eur J Neurosci* 27 (10): 2611-8. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06235.x>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18513318>.
- Commons. 2016. "Ascending serotonin neuron diversity under two umbrellas." *Brain Structure and Function* 221 (7): 3347-3360. <https://doi.org/10.1007/s00429-015-1176-7>.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00429-015-1176-7>.
- Corvaja, *et al.* 1993. "Ultrastructure and synaptic targets of the raphe-nigral projection in the rat." *Neuroscience* 55 (2): 417-27. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90510-m](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90510-m).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7690910>.
- Cuellar-Herrera, *et al.* 2014. "Alterations of 5-HT1A receptor-induced G-protein functional activation and relationship to memory deficits in patients with pharmacoresistant temporal lobe epilepsy." *Epilepsy Res* 108 (10): 1853-63. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2014.09.013>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25304920>.
- Curzon. 1981. "The Turnover of 5-Hydroxytryptamine." In *Central Neurotransmitter Turnover*, edited by C. J. Pycock and P. V. Taberner, 59-80. Boston, MA: Springer US.

- Datiche, *et al.* 1995. "Serotonergic and non-serotonergic projections from the raphe nuclei to the piriform cortex in the rat: a cholera toxin B subunit (CTb) and 5-HT immunohistochemical study." *Brain Res* 671 (1): 27-37. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)01293-q](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)01293-q). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7537163>.
- Daubert, *et al.* 2010. "Serotonin: a regulator of neuronal morphology and circuitry." *Trends Neurosci* 33 (9): 424-34. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.05.005>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20561690>.
- Day, *et al.* 2004. "Differential expression of 5HT-1A, alpha 1b adrenergic, CRF-R1, and CRF-R2 receptor mRNA in serotonergic, gamma-aminobutyric acidergic, and catecholaminergic cells of the rat dorsal raphe nucleus." *J Comp Neurol* 474 (3): 364-78. <https://doi.org/10.1002/cne.20138>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15174080>.
- De los Santos, *et al.* 2018. "Prevalencia de depresión en hombres y mujeres mayores en México y factores de riesgo." *Población y Salud en Mesoamérica* 15: 95-119. http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1659-02012018000100095&nrm=iso.
- De Vivo, *et al.* 1986. "Characterization of the 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor-mediated inhibition of forskolin-stimulated adenylate cyclase activity in guinea pig and rat hippocampal membranes." *J Pharmacol Exp Ther* 238 (1): 248-53. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2941565>.
- De Vry, *et al.* 2004. "5-HT_{1A} receptors are differentially involved in the anxiolytic- and antidepressant-like effects of 8-OH-DPAT and fluoxetine in the rat." *Eur Neuropsychopharmacol* 14 (6): 487-95. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2004.01.004>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15589388>.
- Dillon, *et al.* 1991a. "Autoradiographic analysis of serotonin 5-HT_{1A} receptor binding in the human brain postmortem: effects of age and alcohol." *Brain Res* 554 (1-2): 56-64. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)90171-q](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)90171-q). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1834306>.
- Dillon, *et al.* 1991b. "Autoradiographic analysis of serotonin 5-HT_{1A} receptor binding in the human brain postmortem: effects of age and alcohol." *Brain Research* 554 (1-2): 56-64. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)90171-Q](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(91)90171-Q). <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000689939190171Q>.
- Elliott, *et al.* 1999. "Agonist-stimulated GTP γ [35S] binding to 5-HT_{1A} receptors in human post-mortem brain." *Eur J Pharmacol* 386 (2-3): 313-5. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(99\)00788-8](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(99)00788-8). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10618484>.
- Fidalgo, *et al.* 2013. "Serotonin: from top to bottom." *Biogerontology* 14 (1): 21-45. <https://doi.org/10.1007/s10522-012-9406-3>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23100172>.
- Filip, *et al.* 2009. "Overview on 5-HT receptors and their role in physiology and pathology of the central nervous system." *Pharmacological Reports* 61 (5): 761-777. [https://doi.org/10.1016/s1734-1140\(09\)70132-x](https://doi.org/10.1016/s1734-1140(09)70132-x). <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S173411400970132X>.
- Fletcher, *et al.* 1996. "Electrophysiological, biochemical, neurohormonal and behavioural studies with WAY-100635, a potent, selective and silent 5-HT_{1A} receptor antagonist." *Behav Brain Res* 73 (1-2): 337-53. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(96\)00118-0](https://doi.org/10.1016/0166-4328(96)00118-0). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8788530>.

- Gainetdinov, *et al.* 2004. "Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions." *Annu Rev Neurosci* 27 (1): 107-44. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144206>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15217328>.
- Goldstein. 1980. *Ergot Compounds and Brain Function: Neuroendocrine and Neuropsychiatric Aspects*. Raven Press.
- Gonzalez-Maeso, *et al.* 2002. "Effects of age, postmortem delay and storage time on receptor-mediated activation of G-proteins in human brain." *Neuropsychopharmacology* 26 (4): 468-78. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(01\)00342-6](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(01)00342-6). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11927171>.
- Gozlan, *et al.* 1983. "Identification of presynaptic serotonin autoreceptors using a new ligand: 3H-PAT." *Nature* 305 (5930): 140-2. <https://doi.org/10.1038/305140a0>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6225026>.
- Haggarty, *et al.* 2017. "Pharmacology of Serotonergic and Central Adrenergic Neurotransmission." In *Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy*, edited by D. E. Golan, E. J. Armstrong and A. W. Armstrong, 227-248. Wolters Kluwer.
- Halberstadt, *et al.* 2007. "Selective anterograde tracing of the individual serotonergic and nonserotonergic components of the dorsal raphe nucleus projection to the vestibular nuclei." *Neuroscience* 147 (1): 207-23. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.03.049>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17507165>.
- Hall, *et al.* 1997. "Autoradiographic localization of 5-HT1A receptors in the post-mortem human brain using [3H]WAY-100635 and [11C]WAY-100635." *Brain Research* 745 (1-2): 96-108. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(96\)01131-6](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(96)01131-6). <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899396011316>.
- Halliday, *et al.* 1986. "Comparative anatomy of the ventromedial mesencephalic tegmentum in the rat, cat, monkey and human." *J Comp Neurol* 252 (4): 423-45. <https://doi.org/10.1002/cne.902520402>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3782510>.
- Harrison, *et al.* 2003. "The [35S]GTPgammaS binding assay: approaches and applications in pharmacology." *Life Sci* 74 (4): 489-508. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.07.005>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14609727>.
- Hensler. 2003. "Regulation of 5-HT1A receptor function in brain following agonist or antidepressant administration." *Life Sci* 72 (15): 1665-82. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(02\)02482-7](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(02)02482-7). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12559389>.
- Hensler, *et al.* 2001. "Regulation of 5-HT(1A) receptor-stimulated [35S]-GtpgammaS binding as measured by quantitative autoradiography following chronic agonist administration." *Br J Pharmacol* 132 (2): 605-11. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703855>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11159711>.
- Herkenham. 1987. "Mismatches between neurotransmitter and receptor localizations in brain: observations and implications." *Neuroscience* 23 (1): 1-38. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(87\)90268-5](https://doi.org/10.1016/0306-4522(87)90268-5).
- Hesse, *et al.* 2003. "Is correction for age necessary in neuroimaging studies of the central serotonin transporter?" *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 30 (3): 427-30. <https://doi.org/10.1007/s00259-002-1044-6>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12536247>.

- Hjorth, *et al.* 1982. "8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin, 8-OH-DPAT, a potent and selective simplified ergot congener with central 5-HT-receptor stimulating activity." *Journal of Neural Transmission* 55 (3): 169-188. <https://doi.org/10.1007/bf01276574>.
<https://doi.org/10.1007/BF01276574>.
- Hornung. 2003. "The human raphe nuclei and the serotonergic system." *Journal of Chemical Neuroanatomy* 26 (4): 331-343.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jchemneu.2003.10.002>.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891061803001157>.
- . 2012. "Raphe Nuclei." In *The Human Nervous System*, edited by J.K. Mai and G. Paxinos, 401-424. San Diego: Academic Press.
- Hoyer, *et al.* 1994. "International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin)." *Pharmacol Rev* 46 (2): 157-203.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7938165>.
- Hoyer, *et al.* 1986. "Serotonin receptors in the human brain. I. Characterization and autoradiographic localization of 5-HT_{1A} recognition sites. Apparent absence of 5-HT_{1B} recognition sites." *Brain Res* 376 (1): 85-96. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)90902-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)90902-9). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3719375>.
- Hoyer, *et al.* 1991. "5-HT receptors: subtypes and second messengers." *J Recept Res* 11 (1-4): 197-214. <https://doi.org/10.3109/10799899109066399>.
- Imai, *et al.* 1986. "The organization of divergent axonal projections from the midbrain raphe nuclei in the rat." *J Comp Neurol* 243 (3): 363-80. <https://doi.org/10.1002/cne.902430307>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2419370>.
- Ito, *et al.* 1999. "Localization of 5-HT_{1A} receptors in the living human brain using [carbonyl-¹¹C]WAY-100635: PET with anatomic standardization technique." *J Nucl Med* 40 (1): 102-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9935065>.
- Kalen, *et al.* 1989. "Projections from the medial septum and diagonal band of Broca to the dorsal and central superior raphe nuclei: a non-cholinergic pathway." *Exp Brain Res* 75 (2): 401-16. <https://doi.org/10.1007/BF00247947>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2721618>.
- Kar, *et al.* 2007. "Analysis of Receptor Localization in the Central Nervous System Using In Vitro and In Vivo Receptor Autoradiography." In *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*, edited by Abel Lajtha, Glenn Baker, Susan Dunn and Andrew Holt, 275-292. Boston, MA: Springer US.
- Kazakov, *et al.* 1993. "Sources of cortical, hypothalamic and spinal serotonergic projections: topical organization within the nucleus raphe dorsalis." *Neuroscience* 56 (1): 157-64. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90570-6](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90570-6).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7694184>.
- Kinney, *et al.* 2007. "The development of the medullary serotonergic system in early human life." *Autonomic Neuroscience* 132 (1-2): 81-102.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.autneu.2006.11.001>.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1566070206002967>.
- Kirifides, *et al.* 2001. "Topographic organization and neurochemical identity of dorsal raphe neurons that project to the trigeminal somatosensory pathway in the rat." *J Comp Neurol* 435 (3): 325-40. <https://doi.org/10.1002/cne.1033>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11406815>.

- Kiyasova, *et al.* 2013. "A subpopulation of serotonergic neurons that do not express the 5-HT1A autoreceptor." *ACS Chem Neurosci* 4 (1): 89-95. <https://doi.org/10.1021/cn300157s>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23336048>.
- Kloppel, *et al.* 2001. "Serotonergic nuclei of the raphe are not affected in human ageing." *Neuroreport* 12 (4): 669-71. <https://doi.org/10.1097/00001756-200103260-00010>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11277560>.
- Kluver, *et al.* 1953. "A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system." *J Neuropathol Exp Neurol* 12 (4): 400-3. <https://doi.org/10.1097/00005072-195312040-00008>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13097193>.
- Kohler, *et al.* 1982. "Identification of serotonin and non-serotonin-containing neurons of the mid-brain raphe projecting to the entorhinal area and the hippocampal formation. A combined immunohistochemical and fluorescent retrograde tracing study in the rat brain." *Neuroscience* 7 (4): 951-75. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(82\)90054-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(82)90054-9).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7048127>.
- Korf. 1981. "Turnover of Neurotransmitters in the Brain: An Introduction." In *Central Neurotransmitter Turnover*, edited by C. J. Pycock and P. V. Taberner, 1-19. Boston, MA: Springer US.
- Kovoor, *et al.* 2002. "Gi Irks GIRKs." *Neuron* 33 (1): 6-8. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00572-4](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00572-4). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11779473>.
- Kruger. 1994. "The Bradford method for protein quantitation." *Methods Mol Biol* 32: 9-15. <https://doi.org/10.1385/0-89603-268-x:9>.
- Kuczynski, *et al.* 2011a. "Autoreceptor." In *Encyclopedia of Clinical Neuropsychology*, edited by Jeffrey S. Kreutzer, John DeLuca and Bruce Caplan, 333-333. New York, NY: Springer New York.
- . 2011b. "Heteroreceptor." In *Encyclopedia of Clinical Neuropsychology*, edited by Jeffrey S. Kreutzer, John DeLuca and Bruce Caplan, 1244-1244. New York, NY: Springer New York.
- Kuhar, *et al.* 1986. "Neurotransmitter receptor mapping by autoradiography and other methods." *Annu Rev Neurosci* 9: 27-59. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.09.030186.000331>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2423006>.
- Lanfume, *et al.* 2004. "5-HT1 receptors." *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 3 (1): 1-10. <https://doi.org/10.2174/1568007043482570>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14965240>.
- Lasiuk, *et al.* 2007. "The effects of estradiol on central serotonergic systems and its relationship to mood in women." *Biol Res Nurs* 9 (2): 147-60. <https://doi.org/10.1177/1099800407305600>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17909167>.
- Levitt, *et al.* 1982. "The time of genesis, embryonic origin and differentiation of the brain stem monoamine neurons in the rhesus monkey." *Brain Res* 256 (1): 35-57. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(82\)90095-5](https://doi.org/10.1016/0165-3806(82)90095-5).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7093728>.
- Li, *et al.* 1993. "The sites of origin of serotonergic afferent fibers in the trigeminal motor, facial, and hypoglossal nuclei in the rat." *Neurosci Res* 17 (4): 307-13. [https://doi.org/10.1016/0168-0102\(93\)90114-6](https://doi.org/10.1016/0168-0102(93)90114-6).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8264992>.
- Lu, *et al.* 2002. "Ovarian steroid regulation of 5-HT1A receptor binding and G protein activation in female monkeys." *Neuropsychopharmacology* 27 (1): 12-24.

- [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(01\)00423-7](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(01)00423-7).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12062903>.
- Lucki. 1998. "The spectrum of behaviors influenced by serotonin." *Biol Psychiatry* 44 (3): 151-62. [https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(98\)00139-5](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(98)00139-5).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9693387>.
- Lundberg, *et al.* 2007. "A PET study on regional coexpression of 5-HT1A receptors and 5-HTT in the human brain." *Psychopharmacology (Berl)* 195 (3): 425-33. <https://doi.org/10.1007/s00213-007-0928-3>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17874074>.
- Luppa, *et al.* 2012. "Age- and gender-specific prevalence of depression in latest-life--systematic review and meta-analysis." *J Affect Disord* 136 (3): 212-21. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2010.11.033>.
- Marazziti, *et al.* 1994. "Localization and gene expression of serotonin1A (5HT1A) receptors in human brain postmortem." *Brain Research* 658 (1-2): 55-59. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(09\)90010-5](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(09)90010-5).
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899309900105>.
- Martinez-Levy, *et al.* 2016. "Increased expression of BDNF transcript with exon VI in hippocampi of patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy." *Neuroscience* 314: 12-21. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.11.046>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26621122>.
- Matsubara, *et al.* 1991. "Serotonergic measures in suicide brain: 5-HT1A binding sites in frontal cortex of suicide victims." *J Neural Transm Gen Sect* 85 (3): 181-94. <https://doi.org/10.1007/BF01244944>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1834090>.
- Matthews, *et al.* 2012. "A morphometric, immunohistochemical, and in situ hybridization study of the dorsal raphe nucleus in major depression, bipolar disorder, schizophrenia, and suicide." *J Affect Disord* 137 (1-3): 125-34. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2011.10.043>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22129767>.
- Mattson, *et al.* 2018. "Hallmarks of Brain Aging: Adaptive and Pathological Modification by Metabolic States." *Cell Metab* 27 (6): 1176-1199. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.05.011>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29874566>.
- Mattson, *et al.* 2004. "A neural signaling triumvirate that influences ageing and age-related disease: insulin/IGF-1, BDNF and serotonin." *Ageing Res Rev* 3 (4): 445-64. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2004.08.001>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15541711>.
- Maximino. 2012. *Serotonin in the Nervous System of Vertebrates. Serotonin and Anxiety: Neuroanatomical, Pharmacological, and Functional Aspects*. New York, NY: Springer New York.
- Mazer, *et al.* 1997. "Serotonin depletion during synaptogenesis leads to decreased synaptic density and learning deficits in the adult rat: a possible model of neurodevelopmental disorders with cognitive deficits." *Brain Res* 760 (1-2): 68-73. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(97\)00297-7](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(97)00297-7).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9237519>.
- McDevitt, *et al.* 2011. "Regulation of dorsal raphe nucleus function by serotonin autoreceptors: a behavioral perspective." *J Chem Neuroanat* 41 (4): 234-46. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2011.05.001>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21620956>.

- Meesen, *et al.* 1949. *A cytoarchitectonic atlas of the rhombencephalon of the rabbit*. Basel: Karger.
- Meltzer, *et al.* 2001a. "Gender-specific aging effects on the serotonin 1A receptor." *Brain Research* 895 (1-2): 9-17. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)03211-X](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)03211-X). <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000689930003211X>.
- . 2001b. "Gender-specific aging effects on the serotonin 1A receptor." *Brain Research* 895 (1): 9-17. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)03211-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)03211-X). <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000689930003211X>.
- Meltzer, *et al.* 1998. "Serotonin in aging, late-life depression, and Alzheimer's disease: the emerging role of functional imaging." *Neuropsychopharmacology* 18 (6): 407-30. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(97\)00194-2](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(97)00194-2). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9571651>.
- Meneses, *et al.* 2004. "Expression of the 5-HT receptors in rat brain during memory consolidation." *Behav Brain Res* 152 (2): 425-36. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2003.10.037>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15196811>.
- Meyer. 1997. "Principles of Neurotransmission and Implications for Network Modeling." In *Neural-Network Models of Cognition - Biobehavioral Foundations*, edited by John W. Donahoe and Vivian Packard Dorsel, In *Advances in Psychology*, 82-104. North-Holland.
- Middlemiss, *et al.* 1986. "Binding of the novel serotonin agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin in normal and Alzheimer brain." *J Neurochem* 46 (3): 993-6. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1986.tb13069.x>.
- Mikkelsen, *et al.* 1997. "Central innervation of the rat ependyma and subcommissural organ with special reference to ascending serotonergic projections from the raphe nuclei." *J Comp Neurol* 384 (4): 556-68. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9259489>.
- Millan, *et al.* 2012. "Cognitive dysfunction in psychiatric disorders: characteristics, causes and the quest for improved therapy." *Nat Rev Drug Discov* 11 (2): 141-68. <https://doi.org/10.1038/nrd3628>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22293568>.
- Moller, *et al.* 2007. "Parametric and regional maps of free serotonin 5HT1A receptor sites in human brain as function of age in healthy humans." *Neuropsychopharmacology* 32 (8): 1707-14. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301310>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17251909>.
- Morgan, *et al.* 1987. "Dopamine and serotonin systems in human and rodent brain: effects of age and neurodegenerative disease." *J Am Geriatr Soc* 35 (4): 334-45. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.1987.tb04641.x>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3549845>.
- Neff, *et al.* 1968. "In Vivo Measurement of Brain Serotonin Turnover." In *Advances in Pharmacology*, edited by Silvio Garattini and Parkhurst A. Shore, 97-109. Academic Press.
- Nichols, *et al.* 2008. "Serotonin receptors." *Chem Rev* 108 (5): 1614-41. <https://doi.org/10.1021/cr078224o>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18476671>.
- Nijssen, *et al.* 1992. "Opioid-inhibited adenylyl cyclase in rat brain membranes: lack of correlation with high-affinity opioid receptor binding sites." *J Neurochem* 59 (6): 2251-62. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb10118.x>.
- Ogren, *et al.* 2008. "The role of 5-HT(1A) receptors in learning and memory." *Behav Brain Res* 195 (1): 54-77. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.02.023>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18394726>.

- Oldham, *et al.* 2008. "Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors." *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (1): 60-71. <https://doi.org/10.1038/nrm2299>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18043707>.
- Olszewski, *et al.* 1954. *Cytoarchitecture of the Human Brain Stem*. Basel: Karger.
- Overstreet. 2002. "Behavioral characteristics of rat lines selected for differential hypothermic responses to cholinergic or serotonergic agonists." *Behav Genet* 32 (5): 335-48. <https://doi.org/10.1023/a:1020262205227>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12405515>.
- Palego, *et al.* 1999. "Effects of postmortem delay on serotonin and (+)8-OH-DPAT-mediated inhibition of adenylyl cyclase activity in rat and human brain tissues." *Brain Res* 816 (1): 165-74. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(98\)01156-1](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(98)01156-1).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9878719>.
- Palego, *et al.* 1997. "Apparent absence of aging and gender effects on serotonin 1A receptors in human neocortex and hippocampus." *Brain Research* 758 (1): 26-32. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(96\)01415-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-8993(96)01415-1).
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899396014151>.
- Palmer, *et al.* 1993. "Monoamine neurons in aging and Alzheimer's disease." *J Neural Transm Gen Sect* 91 (2-3): 135-59. <https://doi.org/10.1007/BF01245229>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8099796>.
- Palmer, *et al.* 1998. "Neurochemistry." In *Principles and Practices of Geriatric Medicine*, edited by M.S.J. Pathy. Chichester: John Wiley.
- Pare, *et al.* 1969. "5-hydroxytryptamine, noradrenaline, and dopamine in brainstem, hypothalamus, and caudate nucleus of controls and of patients committing suicide by coal-gas poisoning." *Lancet* 2 (7612): 133-5. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(69\)92442-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(69)92442-8). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4183246>.
- Parsey, *et al.* 2002. "Effects of sex, age, and aggressive traits in man on brain serotonin 5-HT1A receptor binding potential measured by PET using [C-11]WAY-100635." *Brain Res* 954 (2): 173-82. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(02\)03243-2](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(02)03243-2).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12414100>.
- Pasqualetti, *et al.* 1996. "Comparative anatomical distribution of serotonin 1A, 1D alpha and 2A receptor mRNAs in human brain postmortem." *Brain Res Mol Brain Res* 39 (1-2): 223-33. [https://doi.org/10.1016/0169-328x\(96\)00026-5](https://doi.org/10.1016/0169-328x(96)00026-5).
- Paterson, *et al.* 2004. "Differential development of 5-HT receptor and the serotonin transporter binding in the human infant medulla." *J Comp Neurol* 472 (2): 221-31. <https://doi.org/10.1002/cne.20105>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15048689>.
- Paul, *et al.* 2013. "Functional topography of serotonergic systems supports the Deakin/Graeff hypothesis of anxiety and affective disorders." *J Psychopharmacol* 27 (12): 1090-106. <https://doi.org/10.1177/0269881113490328>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23704363>.
- Paxinos, *et al.* 2013. *Atlas of the Human Brainstem*. Elsevier Science.
- Pazos, *et al.* 1987a. "Serotonin receptors in the human brain--III. Autoradiographic mapping of serotonin-1 receptors." *Neuroscience* 21 (1): 97-122. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(87\)90326-5](https://doi.org/10.1016/0306-4522(87)90326-5). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2955249>.
- . 1987b. "Serotonin receptors in the human brain III. Autoradiographic mapping of serotonin-1 receptors." *Neuroscience* 21 (1): 97-122. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522\(87\)90326-5](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522(87)90326-5). <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0306452287903265>.

- Peat, *et al.* 1983. "High-performance liquid chromatographic determination of indoleamines, dopamine, and norepinephrine in rat brain with fluorometric detection." *Anal Biochem* 128 (2): 275-80. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(83\)90375-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(83)90375-5).
- Pecins-Thompson, *et al.* 1999. "Ovarian steroid regulation of serotonin-1A autoreceptor messenger rna expression in the dorsal raphe of rhesus macaques." *Neuroscience* 89 (1): 267-277. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(98\)00326-1](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00326-1). <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452298003261>.
- Peyron, *et al.* 1998. "Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods." *Neuroscience* 82 (2): 443-68. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(97\)00268-6](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(97)00268-6). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9466453>.
- Polter, *et al.* 2010. "5-HT1A receptor-regulated signal transduction pathways in brain." *Cell Signal* 22 (10): 1406-12. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.03.019>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20363322>.
- Puig, *et al.* 2011. "Serotonin and prefrontal cortex function: neurons, networks, and circuits." *Mol Neurobiol* 44 (3): 449-64. <https://doi.org/10.1007/s12035-011-8214-0>.
- Purves. 2012. *Neuroscience*. 5th ed.: Oxford University Press.
- Rabiner, *et al.* 2002. "A Database of [11C]WAY-100635 Binding to 5-HT1A Receptors in Normal Male Volunteers: Normative Data and Relationship to Methodological, Demographic, Physiological, and Behavioral Variables." *NeuroImage* 15 (3): 620-632. <https://doi.org/10.1006/nimg.2001.0984>. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S105381190190984X>.
- Radley, *et al.* 2002. "5-HT1A receptor antagonist administration decreases cell proliferation in the dentate gyrus." *Brain Res* 955 (1-2): 264-7. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(02\)03477-7](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(02)03477-7). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12419546>.
- Raiteri. 2001. "Presynaptic autoreceptors." *J Neurochem* 78 (4): 673-5. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00485.x>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11520887>.
- Rehman, *et al.* 2001. "Neuroendocrinology of ageing." *Age Ageing* 30 (4): 279-87. <https://doi.org/10.1093/ageing/30.4.279>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11509304>.
- Rocha, *et al.* 1996. "Chronic and single administration of pentylentetrazol modifies benzodiazepine receptor-binding: an autoradiographic study." *Epilepsy Res* 24 (2): 65-72. [https://doi.org/10.1016/0920-1211\(95\)00104-2](https://doi.org/10.1016/0920-1211(95)00104-2). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8796354>.
- Rocha, *et al.* 2015. "GABAergic Alterations in Neocortex of Patients with Pharmacoresistant Temporal Lobe Epilepsy Can Explain the Comorbidity of Anxiety and Depression: The Potential Impact of Clinical Factors." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8 (442). <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00442>. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2014.00442>.
- Rocha, *et al.* 2012. "Dopamine abnormalities in the neocortex of patients with temporal lobe epilepsy." *Neurobiol Dis* 45 (1): 499-507. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.09.006>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21964255>.
- Rocha, *et al.* 2006. "GABA and opioid binding distribution in the brain of the seizure-resistant *Proechimys guyannensis*: an autoradiography study." *Synapse* 60 (5): 392-8. <https://doi.org/10.1002/syn.20312>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16847947>.

- Rocha, *et al.* 2007. "Autoradiography reveals selective changes in serotonin binding in neocortex of patients with temporal lobe epilepsy." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31 (6): 1208-18. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2007.04.014>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17513030>.
- Rocha, *et al.* 2009a. "Temporal lobe epilepsy causes selective changes in mu opioid and nociceptin receptor binding and functional coupling to G-proteins in human temporal neocortex." *Neurobiol Dis* 35 (3): 466-73. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.06.008>.
- Rocha, *et al.* 2009b. "Temporal lobe epilepsy causes selective changes in mu opioid and nociceptin receptor binding and functional coupling to G-proteins in human temporal neocortex." *Neurobiology of Disease* 35 (3): 466-473. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2009.06.008>.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969996109001454>.
- Rodríguez-Puertas, *et al.* 2000. "Autoradiography of receptor-activated G-proteins in post mortem human brain." *Neuroscience* 96 (1): 169-80. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(99\)00527-8](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(99)00527-8). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10683421>.
- Rodríguez-Puertas, *et al.* 2000. "Autoradiography of receptor-activated G-proteins in post mortem human brain." *Neuroscience* 96 (1): 169-180. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0306-4522\(99\)00527-8](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0306-4522(99)00527-8).
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452299005278>.
- Rodríguez, *et al.* 2012. "The serotonergic system in ageing and Alzheimer's disease." *Prog Neurobiol* 99 (1): 15-41. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2012.06.010>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22766041>.
- Rodríguez, *et al.* 2012. "The serotonergic system in ageing and Alzheimer's disease." *Progress in Neurobiology* 99 (1): 15-41. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2012.06.010>.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301008212001086>.
- Saxena, *et al.* 1990. "Cardiovascular effects of serotonin agonists and antagonists." *J Cardiovasc Pharmacol* 15 Suppl 7: S17-34. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1702484>.
- Serrats, *et al.* 2004. "An autoradiographic study of the influence of pindolol upon [35S]GTPgammaS binding in rat, guinea pig and human brain." *Int J Neuropsychopharmacol* 7 (1): 27-34. <https://doi.org/10.1017/S1461145703003924>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14720318>.
- Sibille, *et al.* 2001. "Combining genetic and genomic approaches to study mood disorders." *Eur Neuropsychopharmacol* 11 (6): 413-21. [https://doi.org/10.1016/s0924-977x\(01\)00118-3](https://doi.org/10.1016/s0924-977x(01)00118-3).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11704418>.
- Sim, *et al.* 1997. "Anatomical distribution of mu, delta, and kappa opioid- and nociceptin/orphanin FQ-stimulated [35S]Guanylyl-5'-O-(gamma-Thio)-triphosphate binding in guinea pig brain." *The Journal of Comparative Neurology* 386 (4): 562-572. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19971006\)386:4<562::AID-CNE4>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19971006)386:4<562::AID-CNE4>3.0.CO;2-0).
[http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19971006\)386:4<562::AID-CNE4>3.0.CO;2-0](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19971006)386:4<562::AID-CNE4>3.0.CO;2-0).
- Sim, *et al.* 1995. "In vitro autoradiography of receptor-activated G proteins in rat brain by agonist-stimulated guanylyl 5'-[gamma-[35S]thio]-triphosphate binding." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (16): 7242-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.16.7242>.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7638174>.
- Smith. 2014. "Mental health: a world of depression." *Nature* 515 (7526): 181. <https://doi.org/10.1038/515180a>.

- Sosunov, *et al.* 2012. "The mTOR pathway is activated in glial cells in mesial temporal sclerosis." *Epilepsia* 53 Suppl 1: 78-86. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2012.03478.x>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22612812>.
- Sotelo, *et al.* 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. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1990.tb00026.x>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12106075>.
- Sprouse, *et al.* 1987. "Electrophysiological responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT1A and 5-HT1B agonists." *Synapse* 1 (1): 3-9. <https://doi.org/10.1002/syn.890010103>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3505364>.
- Stamford, *et al.* 2000. "Control of dorsal raphe 5-HT function by multiple 5-HT(1) autoreceptors: parallel purposes or pointless plurality?" *Trends Neurosci* 23 (10): 459-65. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(00\)01631-3](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(00)01631-3). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11006462>.
- Steinbusch, *et al.* 1980. "Serotonergic and non-serotonergic projections from the nucleus raphe dorsalis to the caudate-putamen complex in the rat, studied by a combined immunofluorescence and fluorescent retrograde axonal labeling technique." *Neurosci Lett* 19 (2): 137-42. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(80\)90184-6](https://doi.org/10.1016/0304-3940(80)90184-6). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6302595>.
- Steininger, *et al.* 1997. "Serotonergic dorsal raphe nucleus projections to the cholinergic and noncholinergic neurons of the pedunculopontine tegmental region: a light and electron microscopic anterograde tracing and immunohistochemical study." *J Comp Neurol* 382 (3): 302-22. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9861\(19970609\)382:3<302::aid-cne2>3.0.co;2-7](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9861(19970609)382:3<302::aid-cne2>3.0.co;2-7). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9183696>.
- Stockmeier, *et al.* 1998. "Increase in serotonin-1A autoreceptors in the midbrain of suicide victims with major depression-postmortem evidence for decreased serotonin activity." *J Neurosci* 18 (18): 7394-401. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9736659>.
- Stockmeier, *et al.* 1996. "Quantitative subregional distribution of serotonin1A receptors and serotonin transporters in the human dorsal raphe." *Brain Res* 727 (1-2): 1-12. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(96\)00239-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00239-9). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8842377>.
- Suvarna, *et al.* 2018. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Taber, *et al.* 1960. "The raphe nuclei of the brain stem in the cat. I. Normal topography and cytoarchitecture and general discussion." *J Comp Neurol* 114: 161-87. <https://doi.org/10.1002/cne.901140205>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13836517>.
- Tauscher, *et al.* 2001. "Serotonin 5-HT1A receptor binding potential declines with age as measured by [11C]WAY-100635 and PET." *Neuropsychopharmacology* 24 (5): 522-30. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(00\)00227-X](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(00)00227-X). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11282252>.
- Tellez, *et al.* 2010. "Autoradiographic study of serotonin transporter during memory formation." *Behav Brain Res* 212 (1): 12-26. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.03.015>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20226815>.
- Thompson, *et al.* 1995. "Distribution and origin of serotonergic afferents to guinea pig cochlear nucleus." *J Comp Neurol* 351 (1): 104-16. <https://doi.org/10.1002/cne.903510110>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7534772>.

- Underwood, *et al.* 1999. "Dorsal raphe nucleus serotonergic neurons innervate the rostral ventrolateral medulla in rat." *Brain Res* 824 (1): 45-55. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(99\)01181-6](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)01181-6). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10095041>.
- Underwood, *et al.* 1999. "Morphometry of the dorsal raphe nucleus serotonergic neurons in suicide victims." *Biological Psychiatry* 46 (4): 473-483. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3223\(99\)00043-8](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3223(99)00043-8). <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006322399000438>.
- van der Kooy, *et al.* 1980. "Dorsal raphe cells with collateral projections to the caudate-putamen and substantia nigra: a fluorescent retrograde double labeling study in the rat." *Brain Res* 186 (1): 1-7. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(80\)90250-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(80)90250-4). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7357440>.
- van Dyck, *et al.* 2000. "Age-related decline in central serotonin transporter availability with [(123)I]beta-CIT SPECT." *Neurobiol Aging* 21 (4): 497-501. [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(00\)00152-4](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(00)00152-4). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10924762>.
- Wang, *et al.* 1992. "GABAergic innervation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of the rat studied by electron microscopy double immunostaining." *Brain Res Bull* 29 (6): 943-8. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(92\)90169-x](https://doi.org/10.1016/0361-9230(92)90169-x). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1473026>.
- Waselus, *et al.* 2006. "Differential projections of dorsal raphe nucleus neurons to the lateral septum and striatum." *J Chem Neuroanat* 31 (4): 233-42. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2006.01.007>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16540283>.
- Waterhouse, *et al.* 1986. "Topographical distribution of dorsal and median raphe neurons projecting to motor, sensorimotor, and visual cortical areas in the rat." *J Comp Neurol* 249 (4): 460-76, 478-81. <https://doi.org/10.1002/cne.902490403>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3528236>.
- Wester, *et al.* 1984. "Serotonin concentrations in normal aging human brains: relation to serotonin receptors." *Neurobiol Aging* 5 (3): 199-203. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(84\)90063-0](https://doi.org/10.1016/0197-4580(84)90063-0). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6083463>.
- Wirth, *et al.* 2017. "How serotonin receptors regulate morphogenic signalling in neurons." *Prog Neurobiol* 151: 35-56. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.03.007>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27013076>.
- Xu, *et al.* 2012. "Neurotransmitter receptors and cognitive dysfunction in Alzheimer's disease and Parkinson's disease." *Prog Neurobiol* 97 (1): 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2012.02.002>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22387368>.
- Yamamura, *et al.* 1990. *Methods in neurotransmitter receptor analysis*. Raven Press.
- Yohn, *et al.* 2017. "The role of 5-HT receptors in depression." *Mol Brain* 10 (1): 28. <https://doi.org/10.1186/s13041-017-0306-y>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28646910>.
- Zavala-Tecuapetla, *et al.* 2013. "Experimental Models to Study Pharmacoresistance in Epilepsy." In *Pharmacoresistance in Epilepsy: From Genes and Molecules to Promising Therapies*, edited by Luisa Rocha and Esper A. Cavalheiro, 185-197. New York, NY: Springer New York.