



**Universidad
de Valparaíso**
CHILE

UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO
FACULTAD DE MEDICINA
CARRERA DE TECNOLOGÍA MÉDICA



Tecnología Médica
Universidad de Valparaíso

**“EFECTOS DE LA SEROTONINA SOBRE LA EXCITABILIDAD DE LAS CÉLULAS
GANGLIONARES EN LA RETINA DE RATÓN”**

**Seminario de Grado presentado en conformidad a los requisitos para obtener
el Grado Académico de
“Licenciado en Tecnología Médica con mención Morfofisiopatología y citodiagnóstico.”**

Autores

Alejandro Alcaíno Knabe

Profesor Guía

Dr. Andrés Chávez Navarrete

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue financiada por el proyecto FONDECYT 1151091, el Núcleo milenio Biología de las enfermedades Neuropsiquiátricas NuMIND (NC 130011) y por el Centro interdisciplinario de Neurociencias de Valparaíso, (CINV P09-022F).

Quisiera agradecer a los miembros de los laboratorios de “fisiología sináptica y neuromodulación”, y “fisiología neuronal y excitabilidad” del centro interdisciplinario de neurociencias por la incontable ayuda en la comprensión de las bases técnicas, teóricas y prácticas de la técnica utilizada en este estudio, además de los fundamentos y bases de neurociencia de los cuales carecía al momento de comenzar este trabajo.

También agradecer al tutor Andrés Chávez por la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio, por la paciencia y dedicación entregada desde los inicios de este proyecto y las enseñanzas transmitidas durante la realización de este.

Finalmente agradecer a mi familia, pareja y amigos por el apoyo que me han dado durante todos estos años, sin el cual no habría podido realizar este trabajo.



RESUMEN

La serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) es un neurotransmisor y neuromodulador ampliamente distribuido en el sistema nervioso central donde regula la comunicación y excitabilidad neuronal, y de este modo una gran variedad de funciones cerebrales. El primer paso de la visión, la transducción y la codificación de estímulos de luz en señales eléctricas o neuronales, se produce en la retina. En este circuito neuronal, la 5-HT y algunos de sus receptores se encuentran ampliamente distribuidos en diferentes tipos neuronales, incluidas las células bipolares, amacrinas y ganglionares (RGCs). Estas últimas son las encargadas de converger y llevar la señal visual desde la retina en forma de potenciales de acción (PA) hacia centros superiores del cerebro. En la actualidad, los efectos de la 5-HT sobre la excitabilidad de las RGCs, así como sobre el procesamiento de los estímulos visuales, aún no están claros. Es por ello, que con el fin de avanzar en nuestra comprensión sobre la función de la 5-HT en la retina de mamíferos, en el presente trabajo de tesis se utilizaron registros electrofisiológicos de célula única para evaluar los efectos de la 5-HT sobre los PA evocados y el potencial de membrana en reposo de dos tipos de RGC: las del tipo ON que aumentan el disparo de potenciales en respuesta a incrementos de luz y las del tipo OFF que aumentan el disparo en respuesta a disminuciones de luz. Los resultados indican que la aplicación exógena de 5-HT (10 μM) (I) modifica la frecuencia de disparo y (II) disminuye la amplitud de los PA evocados, (III) además de modificar el potencial de membrana en reposo en una manera célula específica, afectando solo a las RGC del tipo OFF, pero no las RGC del tipo ON. Del mismo modo, (IV) la aplicación exógena de TCB-2 (1 μM), un agonista específico para receptores 5-HT_{2A}, modifica el potencial de reposo de las RGC del tipo OFF, pero no las del tipo ON. Juntos estos resultados indican que la 5-HT posiblemente a través de la activación de receptores 5-HT_{2A} modificaría las propiedades intrínsecas y la excitabilidad de las RGC de una manera célula específica afectando las RGCs del tipo OFF, pero no las del tipo ON. De este modo, los resultados sugieren que la 5-HT podría jugar un papel importante en la codificación de señales visuales de baja luminosidad, específicamente reduciendo la excitabilidad de las RGCs OFF y por tanto la magnitud de las señales visuales o PA que son enviadas a centros superiores del procesamiento visual.

ABSTRACT

Serotonin or 5-hydroxytryptamine (5-HT) is a neurotransmitter and neuromodulator widely distributed in the central nervous system, where it regulates neuronal communication and excitability, and thus a wide variety of brain functions. The first step of vision, the transduction and encoding of physical light stimulus into a neuronal signal, occurs in the retina. In this neuronal circuit, the 5-HT and some of its receptors are distributed in different neuronal types, including bipolar cells, amacrine cells and ganglion cells (RGCs). The latter are responsible for converging and carrying the visual signal from the retina in the form of action potentials to superior centers in the brain. However, to date the effects of 5-HT on the excitability of RGCs, as well as on the processing of visual stimulus, is poorly understood. In order to advance our understanding of the role of 5-HT in the mammalian retina, in the present thesis work single-cell electrophysiological recordings are used to evaluate the effect of 5-HT on evoked action potentials and the resting membrane potential of two types of RGC: The ON type that increase the firing of potentials in response to light increments and the OFF type that increase the firing in response to light decreases. The results indicate that the exogenous application of 5-HT (10 μ M) (I) modifies the firing frequency and (II) decreases the amplitude of the evoked action potentials. Moreover, (III) modifies the resting membrane potential in a cell-type specific manner, affecting only OFF RGCs, but not ON RGC. In addition, (IV) exogenous application of TCB-2 (1 μ M), a specific 5-HT_{2A} receptors agonist modifies the resting potential in OFF-type RGC but not ON RGC. Altogether these results suggest that 5-HT possibly through the activation of 5-HT_{2A} could play an important role in the coding of visual signals of low luminosity, specifically reducing the excitability of RGCs OFF and thus modifying the magnitude of the visual signals or AP that are send to higher visual processing centers.

LISTA DE ACRÓNIMOS

5-HT: 5-Hidroxitriptamina o serotonina

5-HTP: 5-hidroxitriptofano

SERT: Transportador de serotonina

SSRI: Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina

5-HTR: Receptores de serotonina

GPCRs: Receptores acoplados a proteína G

RGC: Células ganglionares de la retina

CPI: Capa plexiforme interna

CPE: Capa plexiforme externa

CNE: Capa nuclear externa

CNI: Capa nuclear interna

CCG: Capa de células ganglionares

RBC: Célula bipolar de bastón

CBC: Célula bipolar de cono

BC: Células bipolares

SNC: Sistema nervioso central

PA: Potencial de acción

V_m: Voltaje de membrana

V_{Rep}: Voltaje de reposo

IP₃: Inositol trifosfato

PKC: Proteína quinasa C

PLC: Fosfolipasa C

ACSF: Líquido cefalorraquídeo artificial

cGMP: Guanosina monofosfato cíclica

IR-DIC: Microscopia de contraste de interfaz diferencial infrarroja

FWHM: Ancho a media altura

INDICE

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. EL NEUROTRANSMISOR SEROTONINA	1
1.2. SEROTONINA EN LA RETINA DE VERTEBRADOS	5
1.3. SEROTONINA EN EL PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN VISUAL.....	7
1.4. EFECTOS DE LA SEROTONINA SOBRE LA EXCITABILIDAD NEURONAL.....	11
CAPÍTULO 2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	15
2.1. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	15
2.2. HIPÓTESIS	15
CAPÍTULO 3. OBJETIVOS	16
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	16
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS	17
4.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO	17
4.2. PREPARACIÓN DE REBANADAS DE RETINA	17
4.3. DIFERENCIACIÓN DE LAS RGCS EN LOS SUBTIPOS ON, OFF Y ON/OFF.....	18
4.4. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS	19
4.5. FARMACOLOGÍA	19
4.6. ANÁLISIS DE DATOS.....	20
4.7. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN	22
4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	22
CAPÍTULO 5. RESULTADOS	24
5.1. LA 5-HT AFECTA DE MANERA DIFERENCIAL LA FRECUENCIA DE DISPARO DE PA EN LAS RGC.....	24
5.2. LA 5-HT DISMINUYE LA AMPLITUD DE LOS POTENCIALES DE ACCIÓN EN LAS RGC DEL TIPO OFF PERO NO EN LAS RGC DEL TIPO ON.....	27
5.3. LA 5-HT DESPOLARIZA LA MEMBRANA DE LAS RGC OFF.....	31
5.4. LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR 5-HT _{2A} REPRODUCE LOS EFECTOS PROVOCADOS POR LA 5-HT EN LAS RGCS DEL TIPO OFF.....	33
CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN	36

6.1. LA 5-HT MODULA EL POTENCIAL DE ACCIÓN EN LAS RGC DEL TIPO OFF	36
6.2. LA 5-HT REGULA EL POTENCIAL DE MEMBRANA EN REPOSO DE LAS RGC DEL TIPO OFF	38
6.3. ROL DE LA 5-HT EN EL PROCESAMIENTO VISUAL.....	39
CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES	41
CAPÍTULO 8. ANEXOS	42
CAPÍTULO 9. BIBLIOGRAFÍA	43

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL NEUROTRANSMISOR SEROTONINA

La serotonina (5-hidroxitriptamina o 5-HT) y el aminoácido esencial triptófano del cual deriva este neurotransmisor, pertenecen a un grupo de compuestos aromáticos llamados índoles. Se sabe que la función biológica de la 5-HT es compleja y multifacética, regulando numerosos procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria, además de otros procesos fisiológicos como el sueño y la respiración. En el sistema nervioso central (SNC), la 5-HT es producida mayoritariamente, pero no exclusivamente, en un agregado de neuronas ubicado en la línea media del tallo encefálico y parte estructural del mesencéfalo, conocida como los núcleos de Rafe (1). En estas neuronas, denominadas neuronas serotoninérgicas, se sintetiza la 5-HT en 2 pasos esenciales, primero la enzima triptófano hidroxilasa transforma el triptófano en 5-hidroxitriptofano (5-HTP), para que luego la enzima aminoácido aromático descarboxilasa o 5-hidroxitriptofano descarboxilasa, transforme el 5-HTP en 5-HT (2). Estas neuronas serotoninérgicas del rafe proyectan sus axones hacia diversas áreas del cerebro y la medula espinal (Figura 1.1), donde distribuyen la 5-HT para regular múltiples procesos como la atención, el estado de ánimo, la cognición, sueño, dolor, función motora, función endocrina, entre otras (3). Es por ello, que alteraciones del sistema serotoninérgico han sido involucradas en la patogénesis de múltiples enfermedades neurológicas, como la ansiedad, esquizofrenia y depresión (4). Esta última, es una de las enfermedades neuropsiquiátricas más comunes de nuestro tiempo, afectando a un 4,4% de la población mundial y cerca de un 5% de los chilenos según estimación de la OMS (Organización Mundial de Salud) en 2017 (5). A pesar de que los factores que causan esta patología no han sido completamente clarificados, lo que sí se sabe es que el sistema serotoninérgico se encuentra desregulado en el cerebro de los sujetos depresivos (6–8). De hecho, inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (SSRI) los que aumentan los niveles de 5-HT en el SNC, se han convertido en fármacos de primera línea para el tratamiento de la depresión y otros trastornos mentales (9).

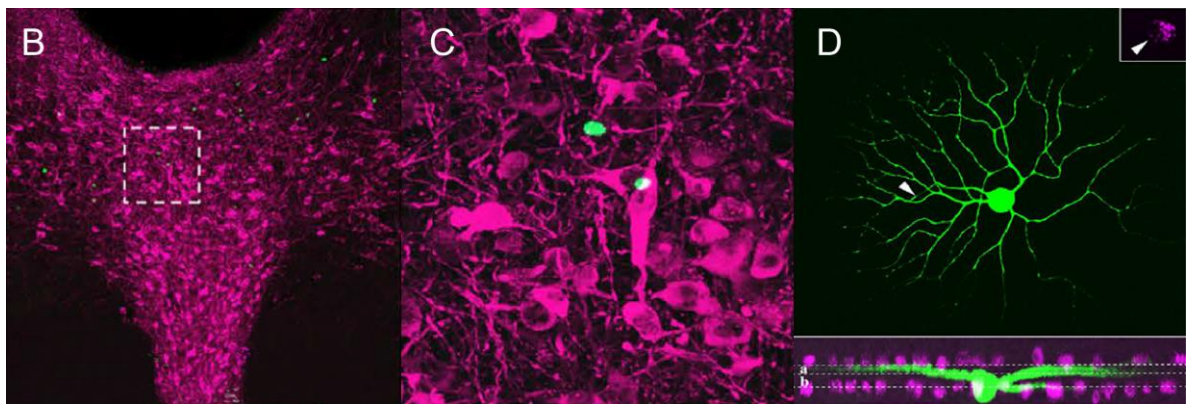
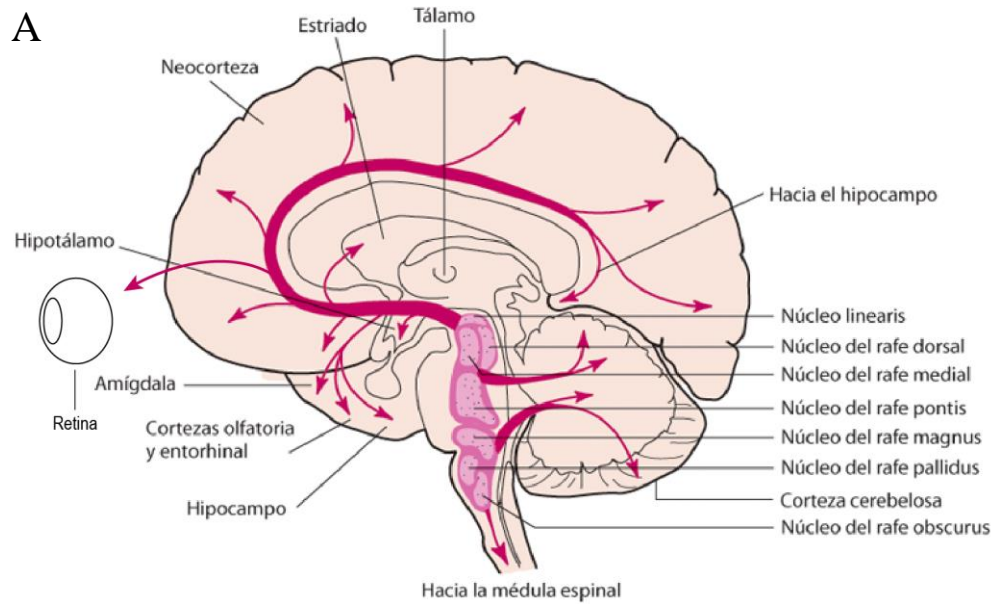


Figura 1.1 *Esquema de las proyecciones de las neuronas serotoninérgicas del Rafe a distintas áreas del cerebro y la retina (A), también de proyecciones desde la retina hacia el Rafe (B, C, D). A, Proyecciones serotoninérgicas de neuronas del Rafe hacia distintas zonas del SNC, entre ellas la retina. B, C. Núcleo del Rafe (magenta) y proyecciones de RGC (verde) mediante marcaje fluorescente retrogrado. D, RGC que proyecta hacia el núcleo del Rafe (10). Modificado de Nestler et al. y Villar et al (1,11).*

Varias líneas de evidencia indican que la compleja acción de la 5-HT en la función neuronal está determinada por distintos subtipos de receptores para 5-HT (5-HTR), los cuales se agrupan en 7 familias (5-HT₁-5HT₇), con un total de 14 subtipos identificados a la fecha. A excepción de los 5-HT₃R que corresponden a receptores ionotrópicos cuya activación desencadena una rápida despolarización y aumenta la concentración de calcio (Ca²⁺) citosólico, todos los otros subtipos de 5-HTR son clasificados como receptores metabotrópicos, de siete segmentos transmembrana acoplados a proteínas fijadoras de guanosina trifosfato (GTP) o proteína G (12). La activación de estos receptores acoplados a proteína G (GPCRs) desencadenan diferentes cascadas de segundos mensajeros para producir una respuesta neuronal de tipo excitadora o inhibitoria (tabla 1.1). Por ejemplo, receptores de la familia de 5-HT₁R se acoplan a través de las proteínas G_i/G_o disminuyendo así los niveles de AMP cíclico y produciendo efectos inhibidores a través de la apertura de canales K⁺ rectificadores de entrada o el cierre de los canales Ca²⁺ (12–15). Por otro lado, la familia de 5-HT₂R (2A, 2B y 2C) que están unidos preferentemente a proteínas G_{q/11} producen efectos excitadores modificando la excitabilidad neuronal al despolarizar las neuronas a través de la activación de la fosfolipasa C (PLC), la hidrólisis de fosfoinositol (IP₃) y el aumento intracelular de Ca²⁺ (16). Dada la gran diversidad de subtipos de 5-HTR y su expresión diferencial en diversos circuitos neuronales, las contribuciones relativas de cada subtipo de receptor a la regulación de las funciones cerebrales aún no están del todo claras.

Tabla 1.1 Clasificación de los receptores de 5-HT en siete familias (5-HT₁-5HT₇), el tipo de proteína a la que se encuentra acoplada, sus respectivos mecanismos celulares y cascadas de señalización además del respectivo efecto final de su activación (12).

Familia	Tipo	Mecanismo	Efecto
5-HT₁	Proteína acoplada Gi/Go	Disminuye niveles celulares de cAMP	Inhibitorio
5-HT₂	Proteína acoplada Gq/11	Incrementa niveles celulares de IP3 y Ca ²⁺	Excitatorio
5-HT₃	Canal catiónico activado por ligando	Despolariza la membrana plasmática	Excitatorio
5-HT₄	Proteína acoplada Gs	Incrementa niveles celulares de cAMP	Excitatorio
5-HT₅	Proteína acoplada Gi/Go	Disminuye niveles celulares de cAMP	Inhibitorio
5-HT₆	Proteína acoplada Gs	Incrementa niveles celulares de cAMP	Excitatorio
5-HT₇	Proteína acoplada Gs	Incrementa niveles celulares de cAMP	Excitatorio

1.2. SEROTONINA EN LA RETINA DE VERTEBRADOS

Para los mamíferos, incluyendo a los humanos, los ojos son el único punto de entrada para que la información visual alcance el cerebro. La retina, ubicada en la parte más interna del globo ocular, es un tejido neural del SNC encargado de transformar las señales luminosas recibidas desde el ambiente externo en señales eléctricas que codifican los diferentes aspectos de la visión (17). Luminosidad, contraste y movimiento son características que la retina es capaz de captar y codificar gracias a la elevada especialización y compleja organización tanto anatómica como fisiológica de las neuronas que la componen (18,19), entre las cuales podemos mencionar los fotorreceptores, las células bipolares, horizontales, amacrinas y ganglionares, además de un tipo de célula glial, las células de Müller (20) (Figura 1.2). La presencia de monoaminas biogénicas en la retina se informó por primera vez hace más de 50 años (21), y la posterior detección de células acumuladoras de 5-HT (22,23), la presencia del transportador (SERT) requerido para la recaptura de 5-HT desde el espacio sináptico (24,25), como la expresión de diversos subtipos de 5-HTRs entre los cuales podemos mencionar los 5-HT_{1A}R, 5-HT_{2A}R, 5-HT_{2C}R y 5-HT₃R (26–34), indican que el sistema serotoninérgico está presente en la retina. Si bien, la localización exacta de estos receptores en la retina de mamíferos todavía no es del todo clara, experimentos farmacológicos han demostrado que todos están involucrados de uno u otro modo en el procesamiento visual a nivel de la retina (35,36). Nueva evidencia demuestra la existencia de proyecciones directas desde las neuronas serotoninérgicas del núcleo del rafe hacia la retina y viceversa (10,11,37–39), sugiriendo que posiblemente la 5-HT estaría desempeñando un rol fisiológico importante en el procesamiento visual. Sin embargo, a la fecha, como y a través de qué mecanismos celulares la 5-HT regula el procesamiento de los estímulos visuales en la retina de mamíferos, no están claros.

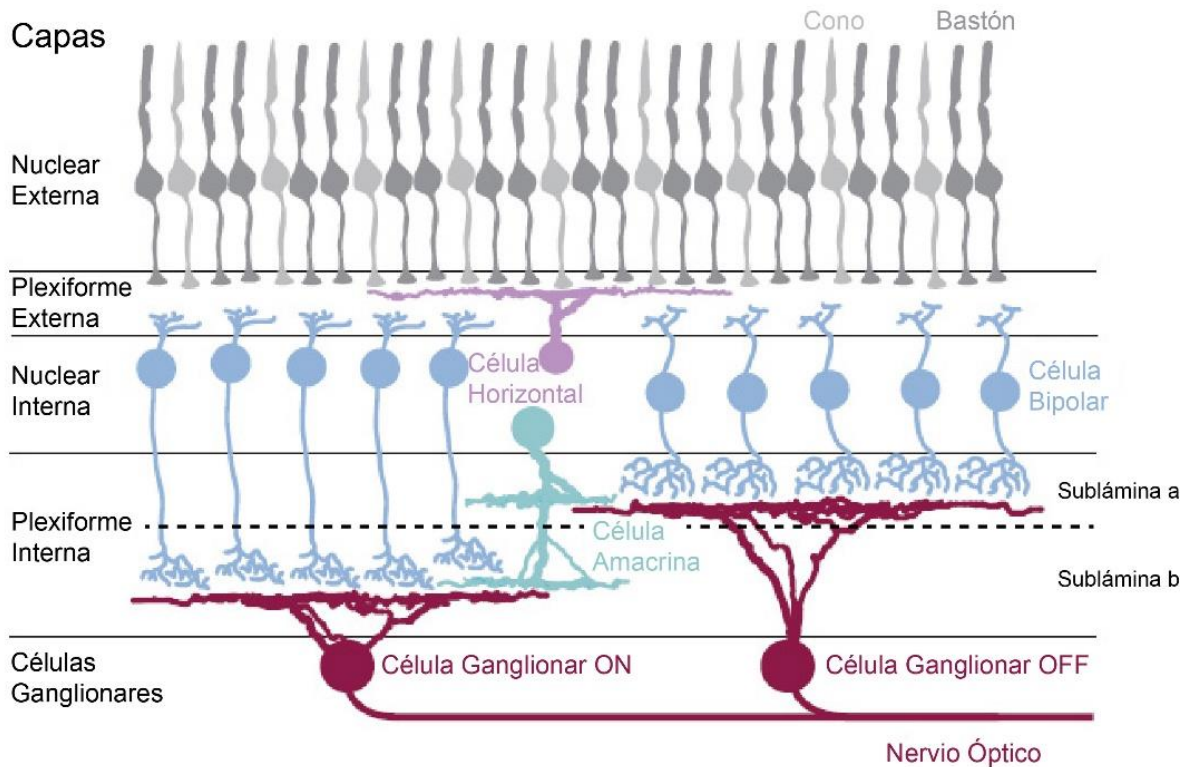


Figura 1.2. Esquema representativo de los diversos tipos celulares y capas que componen la retina de vertebrados. La capa nuclear externa (que contiene los somas de los fotorreceptores), la capa plexiforme externa (donde ocurren las sinapsis o conexiones entre los fotorreceptores, las células bipolares y horizontales). La capa nuclear interna (que posee los somas de las células bipolares, horizontales, y en algunos casos células amacrinas desplazadas). En la parte más interna de la retina se encuentra la capa plexiforme interna (donde ocurren conexiones entre los terminales de las células bipolares, y las dendritas de las células amacrinas y ganglionares). Finalmente se encuentra la capa de células ganglionares (que presentan los cuerpos o somas de las RGCs y en algunos casos células amacrinas desplazadas). Los axones de las RGCs forman el nervio óptico, la salida de la retina hacia el cerebro. Modificado de Dhande et al. (40).

1.3. SEROTONINA EN EL PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN VISUAL

El procesamiento de la información visual comienza como el resultado de interacciones neuronales paralelas en dos capas sinápticas, la capa plexiforme externa (CPE) y la capa plexiforme interna (CPI), y culmina en impulsos nerviosos o potenciales de acción (PA) generados por las células ganglionares (RGCs), cuyos axones envían la información visual hacia el cerebro a través del nervio óptico (Figura 1.2). En la capa más externa de la retina se encuentran los fotorreceptores, células encargadas de realizar la foto-transducción, proceso en el cual la energía lumínica (fotones) es transformada en una señal neuronal. Existen dos tipos de fotorreceptores y su activación depende de las condiciones de luminosidad: los bastones, especializados para la visión escotópica (oscuridad/baja luminosidad) y los conos, que permiten la visión de los colores (visión fotópica). En ausencia de un estímulo lumínico, los fotorreceptores liberan constantemente glutamato, esto es posible gracias a que poseen canales catiónicos que están abiertos en la oscuridad que son dependientes de cGMP (guanosina monofosfato cíclica). El constante flujo de cationes (principalmente sodio y calcio) hacia el interior del fotorreceptor, permite que estos mantengan despolarizaciones constantes y liberen así el neurotransmisor glutamato. Este proceso cesa durante el estímulo de luz principalmente por la activación de una proteína de rodopsina. Esta proteína presenta una unión a un cromóforo que deriva de la vitamina A, el retinal. Este complejo se encuentra en el segmento externo del fotorreceptor. Al ser activada la rodopsina mediante la absorción de un fotón, se genera un cambio conformacional de esta activando una proteína G y una serie de segundos mensajeros intracelulares que culminan con la hidrólisis de cGMP provocando el cierre de los canales catiónicos dependientes de cGMP e hiperpolarizando al fotorreceptor (2). Si bien la expresión de receptores de 5-HT_{1R} ha sido reportada en fotorreceptores (41), su función en la regulación de liberación de glutamato o en la excitabilidad de los fotorreceptores se desconoce. No obstante, la activación de estos receptores ha sido propuesto como un mecanismo neuroprotector previniendo la degeneración de los fotorreceptores en modelos de estudio de degeneración retiniana (42). Por ejemplo, la activación de receptores 5-HT_{1A} ha demostrado prevenir la degeneración de la retina en modelos de retinopatía inducida por luz. En ratones mutantes SOD (Superóxido dismutasa) que desarrollan un estrés oxidativo relacionado con la edad

acelerado en la retina, la activación de 5-HT_{1A}R ha demostrado reducir la degeneración de fotorreceptores (42). Por otro lado, también se ha reportado la expresión de receptores 5-HT₃ en los terminales de los bastones lo que sugiere que estos receptores pueden controlar/regular la visión escotópica o de baja intensidad lumínica mediante una modulación de la liberación de glutamato desde los terminales de los bastones (35,43).

La señal eléctrica evocada por la luz en los fotorreceptores es sucesivamente transmitida hacia las células bipolares (BC) en la CPE. Diez tipos de BC han sido descritas en la retina de mamíferos, nueve que reciben sinapsis directamente desde los conos (células bipolares de cono; CBC), y un solo tipo (la célula bipolar de bastón; RBC) que recibe entradas desde los bastones (44). Estas BC son clasificadas en base a su respuesta frente al estímulo de luz: las células tipo ON que se despolarizan al estímulo de luz (tipo 5 hasta tipo 9, incluida la RBC), y las de tipo OFF (tipos 1 al 4) que se hiperpolarizan en respuesta a un estímulo lumínico. Esta respuesta diferencial se debe a la expresión de distintos tipos de receptores de glutamato en las dendritas de las BC. Las BC del tipo ON (tipo 5 al 9) expresan el receptor de glutamato metabotrópico tipo 6 (mGluR6), cuya activación culmina con el bloqueo de un canal catiónico no selectivo llamado TRPM1 (45,46). En condiciones de oscuridad, dado que hay un flujo continuo de glutamato desde el fotorreceptor hacia la BC ON, estos canales permanecen cerrados. Al cesar el flujo continuo de glutamato durante el estímulo lumínico y por tanto la activación de mGluR6, los canales de TRPM1 son activados, permitiendo la entrada de cationes como sodio (Na⁺) y Ca²⁺ y la sucesiva despolarización de las BC tipo ON (a esta señal se le llama invertida o sign-inverting dado que se invierte la señal de hiperpolarización del fotorreceptor). Por su parte, las BC OFF expresan receptores ionotrópicos de glutamato del tipo AMPA-Kainato que son permeables a cationes y que despolarizan la membrana de las BC OFF al ser activados por el glutamato (47). Dado que el flujo de glutamato desde el fotorreceptor cesa con la estimulación lumínica, las BC OFF responderán ante la luz con una hiperpolarización (es llamada señal conservada o sign-conserving dado que mantiene la señal hiperpolarizante del fotorreceptor). Ambos tipos de BC extienden sus axones desde la CNI hasta la CPI, la cual esta subdividida en 5 sub-láminas (5 divisiones del mismo tamaño de la CPI), éstas se agrupan en dos grandes sub-láminas, la sub-lámina “a” compuesta por la sub-lámina 1 y 2, y la sub-lámina “b” compuesta por las sub-láminas 3,4 y 5 (Figura 1.2). La disposición

anatómica de los axones en estas sub-láminas presenta una correspondencia con las características funcionales de las BC. Esto quiere decir que las BC tipo ON, que se despolarizan al estímulo lumínico, distribuyen sus axones dentro de la sub-lámina *b* de la CPI, mientras que las BC tipo OFF que se hiperpolarizan al estímulo lumínico distribuyen sus axones dentro de la sub-lámina *a* de la CPI (Figura 1.2) (48). La evidencia nos indica que diversos tipos de BC pueden acumular 5-HT dada la expresión del transportador de 5-HT (SERT) (23,24,49), no obstante, el papel funcional de la acumulación de 5-HT en la función de las BCs y la modulación de la señal visual siguen siendo un misterio. Por ejemplo, a la fecha se desconocen las consecuencias funcionales de la activación de receptores de 5-HT₃ expresados específicamente en las BC de cono tipo 5 (50) y de los 5-HT_{2A} presentes en las BC de cono tipo 4 (28). A pesar de ello, la expresión de estos receptores en las BC sugiere que la 5-HT pudiera estar ejerciendo un efecto sobre la función de las BC ON y OFF modificando la liberación de glutamato y por consecuencia el procesamiento de la información visual en la CPI.

El último paso en el procesamiento visual ocurre en la CPI, donde los terminales de las BC transmiten la señal excitadora glutamatérgica hacia las células ganglionares (RGC), quienes convergen y transmiten las señales visuales a través del nervio óptico en forma de PA hacia centros superiores del cerebro como el tálamo o el mismo rafe (10,37–39,51). La conexión de los terminales sinápticos de las BC con las RGC ocurre en las distintas sub-láminas que componen la CPI, y de este modo determinan el tipo de RGCs. Las RGC del tipo ON que reciben entradas desde las BC de tipo ON en la sub-lámina *b*, y las RGC del tipo OFF que reciben entradas de las BC tipo OFF en la sub-lámina *a* de la CPI (Figura 1.2). Un tercer tipo de RGC cuyo árbol dendrítico se estratifica en ambas sub-láminas se conoce como las RGC de tipo ON/OFF, ya que reciben entradas al mismo tiempo de las BC tipo ON y OFF (20,52,53). De este modo, el comportamiento funcional de las RGC ante un estímulo lumínico dependerá del tipo de RGC y recae principalmente en la señal transmitida a estas. Las RGC del tipo ON se despolarizarán ante el estímulo lumínico, las RGC del tipo OFF se hiperpolarizarán ante el mismo estímulo, y las RGC del tipo ON/OFF se despolarizarán tanto al recibir un estímulo lumínico, como al dejar de recibirlo. Estas respuestas están dadas principalmente por la expresión y activación de receptores ionotrópicos de glutamato expresados en las RGC, dado que ante un estímulo lumínico las BC ON transmiten glutamato hacia

las RGC ON, estas se despolarizan a consecuencia de la activación de los receptores de glutamato que poseen, esto explica la respuesta diferencial de cada tipo de RGC. Se ha descrito que en la retina de gato, la 5-HT suprime la actividad de las RGC del tipo ON, mientras que aumenta las del tipo OFF (54). Por otro lado, en la retina de conejo se ha descrito que la activación de 5-HT₁R o la inhibición de 5-HT₂R también modifican el componente ON de las respuestas visuales en las RGC, específicamente reduciendo las respuestas de tipo ON (36,55). Del mismo modo, se ha descrito que activación de los 5HT₃R con un agonista selectivo aumenta las respuestas de las RGCs del tipo ON, mientras que disminuye las respuestas a luz de las RGCs del tipo OFF en condiciones de baja luminosidad (31). Estos efectos de la 5-HT sobre las respuestas visuales en las RGCs ON han sido discutidos en base a una posible modulación por parte de los receptores 5-HT₂ y 5HT₃ en la liberación de glutamato desde los terminales de las BC ON, en particular de las BC de bastón (31). Sin embargo, nueva evidencia indica que los efectos de los agonistas de 5-HT₁ sobre la actividad de las RGCs, se deberían a un aumento de la transmisión inhibitoria GABAérgica en la CPI (56). Esta actividad inhibitoria en la CPI está a cargo de un tipo de células inhibitorias llamadas células amacrinas, responsables de la inhibición lateral (GABAérgica y glicinérgica) e integración sináptica en la CPI, dos procesos fundamentales en el procesamiento de la información visual (20,57,58). Notablemente, un subconjunto de estas células amacrinas pueden acumular o sintetizar 5-HT en varias especies de vertebrados (25,59–61). De este modo, en la CPI, la 5-HT actuando en diferentes niveles tanto sobre la transmisión excitadora desde las BC sobre las RGCs, como también sobre la transmisión inhibitoria desde las células amacrinas, modifica la actividad de las RGCs frente a los estímulos de luz.

Por último, es posible que la 5-HT en la CPI modifique directamente la actividad de las RGCs, alterando sus propiedades intrínsecas o su excitabilidad. Si bien la evidencia actual sobre la expresión y función de los diversos tipos de receptores de 5-HT a nivel de las RGC no es claro, se ha sugerido que los 5-HT_{2c}R expresados en las RGC pueden ser importantes en el crecimiento de neuritas y para la actividad de las RGC en respuesta a los estímulos fisiológicos (29), de manera interesante se ha demostrado que la activación de estos receptores puede aumentar o disminuir la excitabilidad de las neuronas en distintas zonas cerebrales a través de mecanismos que varían dependiendo de la zona cerebral estudiada (62), sin embargo, se desconoce si afectan de la misma

manera a las RGC. Además, el tratamiento con agonistas de 5-HT_{1A}R o antagonistas de 5-HT_{2A}R han mostrado efectos neuroprotectores sobre las RGCs en modelos murinos de degeneración de la retina (63–66), y al igual que los receptores 5-HT_{2C}, ambos pueden aumentar o disminuir la excitabilidad de neuronas en diversas partes del SNC (62,67). Mientras estos efectos neuroprotectores pueden deberse a la modulación de las entradas excitadoras e inhibitoras sobre las RGCs, sus efectos sobre la integración sináptica y la excitabilidad o actividad de las RGCs aún no están claros.

1.4. EFECTOS DE LA SEROTONINA SOBRE LA EXCITABILIDAD NEURONAL

La excitabilidad neuronal es la capacidad de las neuronas de cambiar su potencial eléctrico y transmitir este cambio a través de su axón en forma de PA. En la retina, con excepción de algunos subtipos de células amacrinas y bipolares (68–71), las RGCs son las únicas capaces de cambiar su actividad eléctrica y disparar PA para enviar la información visual a través del nervio óptico hacia el tálamo. En el reposo (estado en ausencia de estímulos) la superficie extracelular de las RGCs posee un exceso de cargas positivas, mientras que la superficie citoplasmática posee un exceso de cargas negativas. La separación de cargas por parte de la membrana lipídica da origen a una diferencia de potencial eléctrico, o de voltaje, a través de la membrana llamado *potencial de membrana*. Usualmente el valor de este potencial varía entre -60 mV y -70 mV. Ante un estímulo, las neuronas responden con una variación en el voltaje de membrana (V_m). Esta respuesta puede ser pasiva o activa. El cambio pasivo en el V_m que se produce en respuesta a la hiperpolarización (cuando el V_m se vuelve más negativo) o despolarización (cuando el V_m se vuelve más positivo) no depende de la apertura o cierre de los canales dependientes de voltaje. Más bien, la corriente iónica que produce las respuestas eléctricas pasivas fluye principalmente a través de canales selectivos de potasio (K^+) que están siempre abiertos. Estos canales de K^+ (llamados canales de K^+ en reposo) son, en gran medida, responsables del mantenimiento del potencial de reposo (V_{rep}) a través de la membrana celular. El cambio activo del V_m que se produce en respuesta a un estímulo

que sobrepasa un umbral de despolarización, depende de la apertura o cierre de numerosos canales iónicos dependientes de voltaje y selectivos para Na^+ y K^+ . Estos cambios breves (~ 1 ms) e intensos del V_m se conocen como *potenciales de acción*, los cuales se propagan sin decremento a lo largo de los axones, es decir, una vez se ha iniciado un cambio activo en el V_m , la señal viaja por la membrana celular, produciendo la misma intensidad de cambio del V_m en cada punto del axón (2,51).

Generalmente, un PA comienza cuando la despolarización pasiva (despolarización que no requiere apertura de canales activados por voltaje) de una membrana excitable alcanza un valor umbral (potencial umbral; Figura 1.3), luego de alcanzar un valor umbral se desencadena la activación o apertura de una gran cantidad de canales de Na^+ y K^+ activados por voltaje lo que provoca que la membrana aumente de manera significativa su permeabilidad a estos iones y por lo tanto aumente su conductancia (facilidad con la que los iones pueden atravesar la membrana). El aumento drástico en el ingreso de Na^+ de la célula es la causa principal del cambio rápido en el V_m . Este cambio será progresivo hasta que el V_m se acerque al potencial de equilibrio del Na^+ (donde no hay movimiento neto de iones entre los espacios intra y extracelular) el cual varía entre los +10 y +50 mV. A medida que el PA alcanza su cumbre, la conductancia del Na^+ disminuye y la conductancia del K^+ aumenta, produciéndose una salida de iones de K^+ desde el interior de la célula a favor de su gradiente electroquímico. El abandono de cargas positivas (flujo de K^+) junto con la inactivación rápida de los canales de Na^+ (una de las propiedades biofísicas de estos canales), provoca que el potencial de membrana se repolarice volviendo al reposo, o en ocasiones, llegando a una leve hiperpolarización que disminuye hasta llegar al V_{rep} , dando así por finalizado el PA. El corto periodo en el que el V_m es positivo se denomina sobreescarga. Durante la última fase del PA (proceso de repolarización), las neuronas no pueden volver a disparar un nuevo PA independiente de la intensidad del estímulo, lo que se conoce como periodo refractario absoluto (Figura 1.3).

La probabilidad de generar un PA por parte de una neurona o en este caso una RGC, no solo depende de las conductancias de Na^+ y K^+ presentes en estas células excitables, sino también dado el proceso de integración de la comunicación excitadora (señales que aumentan las

probabilidades de que surja un PA) o inhibitorias (señales que reducen la probabilidad de un PA). Si bien, la evidencia actual sugiere que la 5-HT puede modificar la actividad de las RGCs mediante la regulación de la transmisión excitadora desde las BC mediante la activación de receptores 5-HT₂ y 5-HT₃, así como la transmisión inhibitoria desde las células amacrinas mediante la activación de receptores 5-HT₁ (31,56) se desconoce si la 5-HT puede modular directamente el disparo de PA o influir en el potencial de reposo mediante la activación de receptores directamente expresados en las RGCs (26,29), algo esencial para influenciar el procesamiento visual.

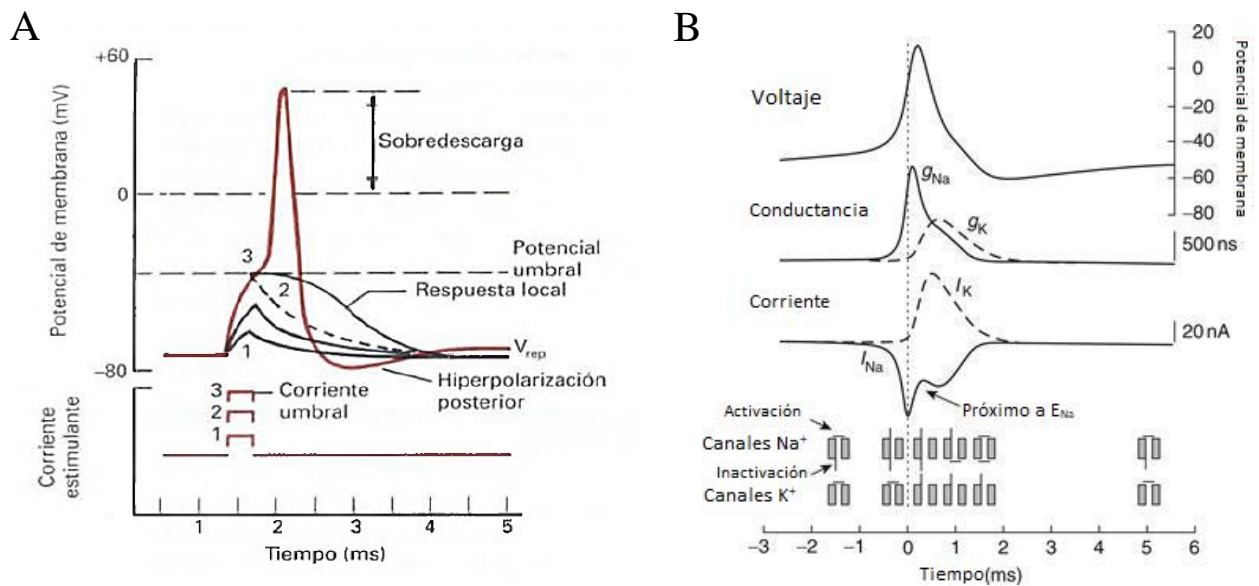


Figura 1.3. Esquema de las distintas fases del potencial de acción y de los cambios en las conductancias y corrientes asociados a estas fases. **A.** distintas fases de un potencial de acción evocado por corrientes de distintas intensidades. 1, corriente de baja intensidad que genera un cambio pasivo (subumbral) en el potencial de membrana. 2, corriente de mayor intensidad, aún insuficiente para desencadenar un potencial de acción. 3, corriente umbral que genera el disparo de un potencial de acción (la línea punteada bajo este número indica la respuesta pasiva de la membrana en caso de no sobrepasar el umbral de disparo)(72). **B.** Cambios en las conductancias, corrientes y voltaje asociados a las distintas fases del potencial de acción, en la parte inferior se ilustra los cambios en la apertura, cierre y bloqueo de los canales de Na⁺ y K⁺ (73).

En otras zonas del SNC, se ha demostrado que la 5-HT es capaz de modular distintos tipos de canales de K^+ involucrados en la mantención del potencial de reposo. Por ejemplo, en la amígdala la activación de receptores 5-HT_{2C} genera un cambio en el potencial de reposo mediante el bloqueo de un tipo de canal de K^+ llamado GIRK (74). Otros mecanismos de modulación a cargo de la 5-HT han sido descubiertos, como son la reducción de conductancias de K^+ (75,76), la modulación de proteínas intercambiadoras de iones (77) o de canales de Cl^- (78). Del mismo modo, los efectos de la 5-HT sobre generación de PA han sido descritos en diversas áreas del SNC. Por ejemplo, en la corteza prefrontal se ha demostrado que la activación de receptores 5-HT₂ disminuye las corrientes de Na^+ y así la excitabilidad neuronal (62). De la misma manera, la activación del receptor 5-HT_{1A} ha demostrado disminuir las corrientes de Na^+ e influenciar el PA en la corteza prefrontal (67). Indudablemente la evidencia indica que la activación de algunos receptores de 5-HT conlleva un cambio en la excitabilidad neuronal, sin embargo, a la fecha no existe evidencia que demuestre que la excitabilidad de las RGCs pueda ser afectada por la 5-HT.

Es por ello, que el principal objetivo de este trabajo consiste en dilucidar si la 5-HT puede modificar la excitabilidad de las RGCs en la retina de ratón, cambiando su excitabilidad y, por lo tanto, la manera que estas responden a los estímulos visuales provenientes desde el mundo exterior. Responder a esta interrogante no solo aportará a nuestra comprensión de los mecanismos celulares y moleculares que subyacen el procesamiento visual en la retina en condiciones normales, sino que también nos puede proporcionar información relevante para comprender los posibles efectos de fármacos que apuntan a modificar los niveles de 5-HT sobre la función de las RGCs y el procesamiento visual, fármacos que son actualmente utilizados para el tratamiento de algunos trastornos neuropsiquiátricos como la ansiedad y la depresión y, que en última instancia, pueden conducir al desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento de estas patologías, sin efectos secundarios en nuestra capacidad de ver el mundo exterior.

CAPÍTULO 2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Mientras numerosa evidencia demuestra que el sistema serotoninérgico se encuentra expresado en la retina de diversas especies, incluidas conejos, ratas y humanos (26,27,36,79), modificando la actividad fisiológica de las células que componen la retina, a la fecha, como la 5-HT regula nuestra capacidad de ver el mundo exterior aún no es del todo claro. En particular, se desconocen los mecanismos celulares y moleculares por los cuales 5-HT puede regular la actividad fisiológica de las RGCs. Dado que las RGC son la única salida de información desde la retina hacia los centros superiores del procesamiento visual, un cambio en la excitabilidad (capacidad de una neurona para responder a un estímulo) podría facilitar o dificultar la transmisión de la información visual y así influenciar la forma en que percibimos el medio ambiente que nos rodea.

2.1. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Puede la 5-HT regular la excitabilidad de las células ganglionares en la retina de ratón? y si es así, ¿Cuál de sus receptores estaría involucrado?

2.2. HIPÓTESIS

La 5-HT modula la excitabilidad de las células ganglionares del tipo ON y OFF mediante cambios en el potencial de membrana en reposo y en la frecuencia de disparo de los potenciales de acción, modificando así la magnitud de las señales visuales que son enviadas a centros superiores del procesamiento visual.

CAPÍTULO 3. OBJETIVOS

Con el fin de dar respuesta a nuestra hipótesis nos hemos planteado los siguientes objetivos.

3.1. OBJETIVO GENERAL

Examinar los efectos fisiológicos que produce la aplicación exógena de 5-HT sobre la excitabilidad de las células ganglionares ON y OFF en rebanadas de retina de ratón.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Analizar el efecto de la aplicación exógena de 5-HT (10 μ M) sobre la frecuencia de disparo, parámetros de amplitud, ancho a media altura, tiempos de despolarización y caída de potenciales de acción en células ganglionares ON y OFF en la retina de ratón.
- II. Analizar el efecto de la aplicación exógena de 5-HT (10 μ M) sobre el potencial de membrana de las células ganglionares ON y OFF en la retina de ratón.
- III. Identificar el receptor de 5-HT específico que pudiese estar involucrado en un cambio de la excitabilidad de las RGC en la retina de ratón.

CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

En este trabajo se utilizaron 12 ratones C57BL/6J *wild-type* de edad comprendida entre los días postnatales 20 y 40 (P20-P40) de ambos sexos. Los animales fueron mantenidos en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas en condiciones de temperatura (22-25°C) y humedad controladas, con acceso a comida *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales han sido realizados siguiendo las directrices del protocolo bioético establecido por el “National Institutes of Health” (USA) y aprobado por el Comité de Bioética para estudios científicos en animales de la Universidad de Valparaíso de Chile (BS031/2016).

4.2. PREPARACIÓN DE REBANADAS DE RETINA

Para la obtención de las rebanadas de retina los animales fueron anestesiados con isoflurano, luego decapitados y los ojos rápidamente enucleados. Las retinas fueron aisladas de los ojos, realizando una disección bajo un microscopio estereoscópico (Leica S6T) en líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF) compuesto por (en mM): 119 NaCl, 23 NaHCO₃, 1,25 Na₂HPO₄, 2,5 KCl, 2,5 CaCl₂, 1,5 MgSO₄, 10 glucosa, 2 Na⁺-piruvato y 2 Na⁺-lactato (pH 7,4; 290 mOsm), a temperatura ambiente y en condiciones de continua oxigenación (95% O₂/5% CO₂) (80). Brevemente, utilizando material de microdisección (pinzas n° 5, 5/45 y tijera tipo Spring, Fine Science Tools), se eliminó la córnea y el cristalino de cada ojo, luego se limpió la copa óptica del humor vítreo y se separó el epitelio pigmentado de la retina. Las retinas obtenidas fueron cortadas en dos secciones de aproximadamente 1 x 2 x 0,2 mm e incluidas en agar de bajo punto de fusión (3% p/v en una solución de ACSF-Hepes, compuesto por (en mM): 119 NaCl, 24 HEPES, 1,25 Na₂HPO₄, 2,5 KCl, 2,5 CaCl₂, 1,5 MgSO₄, pH 7,4) para ser finalmente cortadas en secciones transversales de 210 μm de grosor utilizando un vibrátomo VT1200s (Leica, Germany). Cabe

destacar que solo una de las secciones verticales de una retina fue utilizada, ya que ésta genera aproximadamente 10 rebanadas de retina, lo que fue suficiente para un día de trabajo. La retina sobrante fue utilizada por otros investigadores del laboratorio. Las rebanadas se dejaron estabilizar por un periodo de 30 minutos en ACSF a temperatura ambiente antes de proceder con los registros electrofisiológicos. Todo el proceso se realizó en condición fotópica – adaptación a la luz - y bajo continua oxigenación. Posteriormente, las rebanadas o cortes de retina fueron montadas en un microscopio NIKON Eclipse FN1 de fase fija y visualizadas mediante microscopia de contraste de interfaz diferencial infrarroja (IR-DIC). En el microscopio, las rebanadas se mantuvieron bajo perfusión continua con ACSF (saturado con 95% O₂/5% CO₂) y en condiciones de temperatura controlada a 28 °C.

4.3. DIFERENCIACIÓN DE LAS RGCs EN LOS SUBTIPOS ON, OFF Y ON/OFF

Dado que la distinción anatómica de los subtipos funcionales de RGCs (ON, OFF y ON/OFF) es imposible de realizar mediante microscopia IR/DIC (al menos sin marcadores genéticos), se incluyó en la solución intracelular el fluoróforo Alexa 488 (Invitrogen) a una concentración final de 10 µM. Esto permitió que, al difundir la solución intracelular desde la pipeta de registro hacia el interior de la RGC, el fluoróforo ocupe el volumen interno de la neurona permitiendo la distinción de la estratificación de sus dendritas mediante microscopia de epifluorescencia. De todas las RGC registradas (n = 26), ninguna resulto poseer estratificación dendrítica en ambas sub-láminas de la CPI, por lo que no se pudo evaluar el efecto farmacológico en el subtipo ON/OFF. Las imágenes representativas de fluorescencia y campo claro de las RGC OFF y ON, fueron realizadas mediante el software Image J (81) y su paquete de procesamiento Fiji (82). La imagen de fluorescencia representa un z-stack de varios planos para representar la mayor parte de sus ramificaciones dendríticas superpuestas sobre una imagen representativa de la misma sección mediante campo claro IR/DIC.

4.4. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS

Los registros electrofisiológicos de las RGCs ON y OFF se realizaron mediante la técnica de fijación de membrana (o en inglés *patch-clamp*) en modo célula entera, y con una solución intracelular en base a metanosulfonato de K^+ , con la siguiente composición (en Mm): 130 KMeSO₄, 4 KCl, 5 NaCl, 10 HEPES, 0.5 EGTA, 7 Na₂-fosfocreatina, 4 MgATP, 0.4 NaGTP (pH= 7,3 ; 280 mOsm), con el fin de realizar mediciones de voltaje a través del tiempo y analizar los PA evocados por inyección de corriente de 50 pico amperes (pA) durante 500 milisegundos (ms). Para realizar la fijación de la membrana se utilizaron electrodos en vidrio borosilicato (Warner Instruments) con una resistencia entre 4 y 6 MΩ, adecuada al tamaño del soma de las RGC. Los PA y el potencial de membrana se registraron utilizando el amplificador Multiclamp 700B (Molecular Devices), fueron filtradas a 2 kHz y adquiridas a 10 kHz y se analizaron mediante el programa Igor-Pro (Wavemetrics, v6.37) y Origin-Pro (OriginLab, 2017).

4.5. FARMACOLOGÍA

Para analizar el efecto de la 5-HT sobre las RGC ON y OFF se aplicó en el baño 5-HT (Tocris) a una concentración de 10 μM por un máximo de 10 minutos. El fármaco se preparó en H₂O Miliq de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Para determinar si los receptores de 5-HT₂ se encuentran involucrados en los efectos de la 5-HT, se utilizó un agonista selectivo de los receptores 5-HT_{2A}, TCB-2 (Tocris) a una concentración final de 1 μM. Este fármaco fue preparado en DMSO de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Todas las otras sales utilizadas para la preparación de la solución intracelular y extracelular fueron obtenidas desde Sigma-Aldrich.

4.6. ANÁLISIS DE DATOS

A los PA registrados desde los distintos tipos de RGCs se les realizaron mediciones de frecuencia, amplitud, ancho a media altura (FWHM), tiempo de despolarización y tiempo de caída del potencial de acción antes, durante y después de la aplicación farmacológica de 5-HT o TCB-2 con el fin de determinar la acción de estos compuestos sobre el PA (ver Figura 4.1). Todos estos parámetros fueron medidos utilizando el programa Igor Pro 6.37 con el conjunto de herramientas Neuromatic desarrollados para Igor Pro (83). Todas estas mediciones, a excepción de la frecuencia en la cual se midió el tren de PA evocados durante la estimulación fija de 500 ms, se realizaron en el primer PA evocado por la inyección de corriente. Para el análisis del tiempo de despolarización se analizó el tiempo que demoró el PA en recorrer desde el 10% al 90% del peak, como se muestra en la figura 4.1^a. Para el análisis del tiempo de caída del PA se realizó la medición del tiempo que demoró el potencial de acción en caer desde el 100% de su peak hasta el 37% del peak como se ilustra en la figura 4.1B. En la figura 4.1C se ilustra la medición del FWHM.

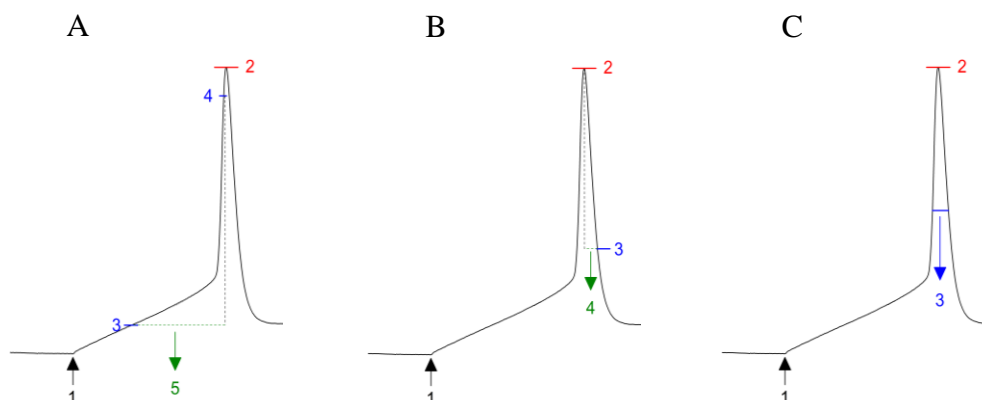


Figura 4.1. Parámetros de medición realizados al potencial de acción. A, medición del del tiempo de despolarización desde el 10% al 90%, donde 1 indica el inicio de la despolarización del PA (0%), 2 el peak de la despolarización del potencial de acción (100%). La medición del tiempo (5) se realizó entre el 10% (3) y el 90% (4) del PA evocado. B, medición del del tiempo de caída del potencial de acción al 37%, en donde 1 es el inicio (0%), 2 indica el peak (100%) y 3 el 37%; 4 indica el tiempo entre 2 y 3. C, Para la medición del ancho a media altura (FWHM) del PA se calculó el tiempo que demora el PA entre el 50% de la base de subida o despolarización y el 50% de la caída o repolarización, tomado desde el peak (2) del PA.

Por otro lado, el potencial de reposo fue registrado mediante Igor Pro donde se midió el voltaje de reposo 1 vez cada 30 segundos en las RGCs que evocaban PA, y 1 vez cada 10 segundos en las RGCs que no evocaron PA durante la inyección de corriente de 50 pA. La medición se mantuvo por 10 minutos antes de la aplicación farmacológica y se extendió por al menos 20 minutos luego de aplicar la 5-HT o algún otro fármaco. En el análisis se compararon 3 condiciones, control (primeros 10 minutos en ausencia de fármacos), aplicación del fármaco (10 minutos donde se mantuvo el fármaco en el baño) y el lavado (10 minutos donde el tejido fue perfundido con ACSF sin presencia de fármacos). Para la presentación de los resultados, se promediaron las mediciones durante las 3 condiciones y se realizaron las figuras respectivas utilizando el programa Origin Pro 2017.

4.7. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Se incluyeron en este estudio todas las RGCs que presentaron una línea base (o control) con un potencial de membrana de reposo estable, y con una variación de este no mayor a ± 5 mV. De la misma manera, se incluyeron las células que no presentaron cambios en la resistencia de entrada (que varía entre 25 y 30 M Ω) mayores al 20 % durante la aplicación de estimuladores farmacológicos durante el tiempo del experimento. Ya que la resistencia de entrada es una medida de viabilidad neuronal tanto morfológica como funcional, cambios mayores a esto indican que la neurona se encuentra en proceso de degeneración o un sello incorrecto durante el registro electrofisiológico. Por otro lado, no se incluyeron en este estudio RGC que presentaron resistencias de entrada superiores a 40 mega M Ω .

4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los valores obtenidos se realizó utilizando el programa Origin Pro 2017. Para determinar la presencia de cambios significativos en los valores amplitud, FWHM, tiempo de despolarización y tiempo de caída de los PA antes y durante la aplicación farmacológica, se realizó un test estadístico Student T test pareado que permitió identificar la presencia de cambios estadísticamente significativos entre la condición control (base en ausencia de fármacos) en comparación con la aplicación de fármacos. Para ambos casos se analizaron 10 minutos de línea base y 10 minutos de aplicación del fármaco correspondiente. Para el análisis estadístico del potencial de membrana en reposo y la frecuencia de PA evocados se realizó el test ANOVA de una vía y el test post hoc Bonferroni para determinar entre que grupos existe diferencia significativa (control vs aplicación de droga vs lavado de la droga). Uno de los requisitos del test ANOVA es que los grupos de análisis presenten homogeneidad de las varianzas, por lo que se realizó el test Levene's en cada ocasión que se realizó el test ANOVA para confirmarlo (en todos los casos se cumplió). Previo a la realización de los test nombrados, se confirmó la distribución normal de los datos mediante el test de normalidad Shapiro Wilk. En los casos que se presentaran datos atípicos

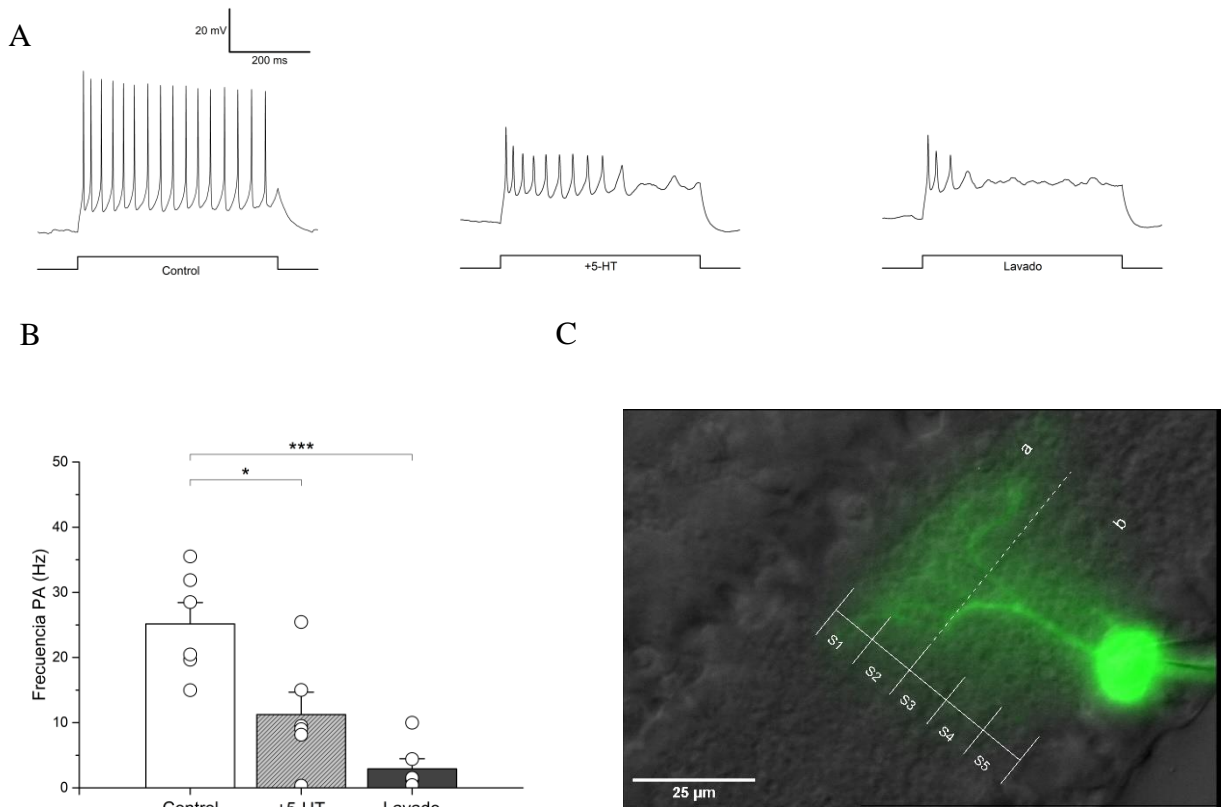
o también denominados “outlier”, se realizó el test Grubbs para la identificación de outliers y ser excluidos del análisis. Solo una célula fue descartada del análisis mediante este test y correspondió a una RGC ON, la cual se excluyó del análisis del tiempo de despolarización del PA. Los cambios con valor de $p < 0,05$ fueron considerados significativos. Los valores en las figuras corresponder al promedio +/- el error medio estándar (SEM).

CAPÍTULO 5. RESULTADOS

5.1. LA 5-HT AFECTA DE MANERA DIFERENCIAL LA FRECUENCIA DE DISPARO DE PA EN LAS RGCs

Con el fin de evaluar los efectos de la 5-HT sobre la excitabilidad de las RGC se procedió a examinar el efecto de la aplicación exógena de 5-HT (10 μ M; 10 min) sobre la frecuencia de PA evocados por un estímulo de 50 pA con una duración de 500 ms y repetida cada 30 segundos. Al final de cada registro se visualizó mediante epifluorescencia la ramificación dendrítica de cada RGC registrada, lo que permitió distinguir y clasificar los subtipos de RGC en OFF (Figura 5.1C) y ON (Figura 5.2C). De las 26 RGCs registradas durante este trabajo, ninguna RGCs presento ramificaciones dendríticas en ambas sub-láminas de la CPI, por lo que no fue posible evaluar el efecto sobre las RGC tipo ON/OFF.

Como se muestra en la Figura 5.1, la aplicación exógena de 5-HT disminuyó la frecuencia de PA evocados en las RGCs del tipo OFF desde $25.16 \text{ Hz} \pm 3.26$ hasta $11.24 \text{ Hz} \pm 3.42$ ($n = 6$, $p = 0.011$). Esta disminución no se recuperó luego del lavado de la 5-HT desde el medio extracelular, e incluso aumentó su disminución hasta $2.91 \text{ Hz} \pm 1.54$ comparado a la condición control ($n = 6$, $p = 0.00019$). Por el contrario, la aplicación de 5-HT sobre las RGC del tipo ON no generó cambios estadísticamente significativos en la frecuencia de PA (Control: $25.09 \text{ Hz} \pm 6.95$ vs 5-HT: $24.17 \text{ Hz} \pm 7.13$, $n = 5$, $p = 1$). Esto se mantuvo incluso después del lavado de la droga ($25.45 \text{ Hz} \pm 7.06$, $n = 5$, $p = 1$ vs control; Figura 5.2). Estos resultados muestran un accionar diferencial de la 5-HT sobre las RGCs, indicando que la disminución en la frecuencia de PA producida por la 5-HT es un fenómeno que ocurre de manera célula específica afectando las RGC del tipo OFF, pero no en las RGC del tipo ON. Dado que no se logró evaluar los efectos de la 5-HT sobre las RGC de tipo ON/OFF, no se puede asegurar que este efecto sea exclusivo sobre las RGC OFF, ya que podría ocurrir también en las de RGC ON/OFF.



*Figura 5.1. Efecto de la aplicación exógena de 5-HT sobre la frecuencia de disparo de potenciales de acción evocados en las RGCs del tipo OFF. A, Trazados representativos de PA evocados por un pulso despolarizante (50 pA, 500 ms duración) antes (izquierda), durante (centro) y después (derecha) de la aplicación de 5-HT (10 μM) por 10 minutos. B, Gráfico promedio de la frecuencia de disparo de PA (en Hz) en las tres condiciones. Asterisco sobre el gráfico de barras representa diferencia significativa estadística entre las condiciones evaluadas mediante Test ANOVA de una vía y post-hoc Bonferroni. * = $p < 0.05$, *** = $p < 0.001$. En el gráfico, las barras representan el promedio más el error estándar de la media y los círculos el valor individual por célula registrada. C, Fotomicrografía representativa de la RGC OFF obtenida mediante microscopía IR-DIC y superpuesta con la imagen de epifluorescencia visualizando el fluoróforo Alexa Fluor 488 al interior de la RGC. En blanco se observan las divisiones de la CPI lo que permite distinguir una estratificación en la sub-lámina a, característica de las RGCs del tipo OFF. Barra en blanco = escala de 25 μm.*

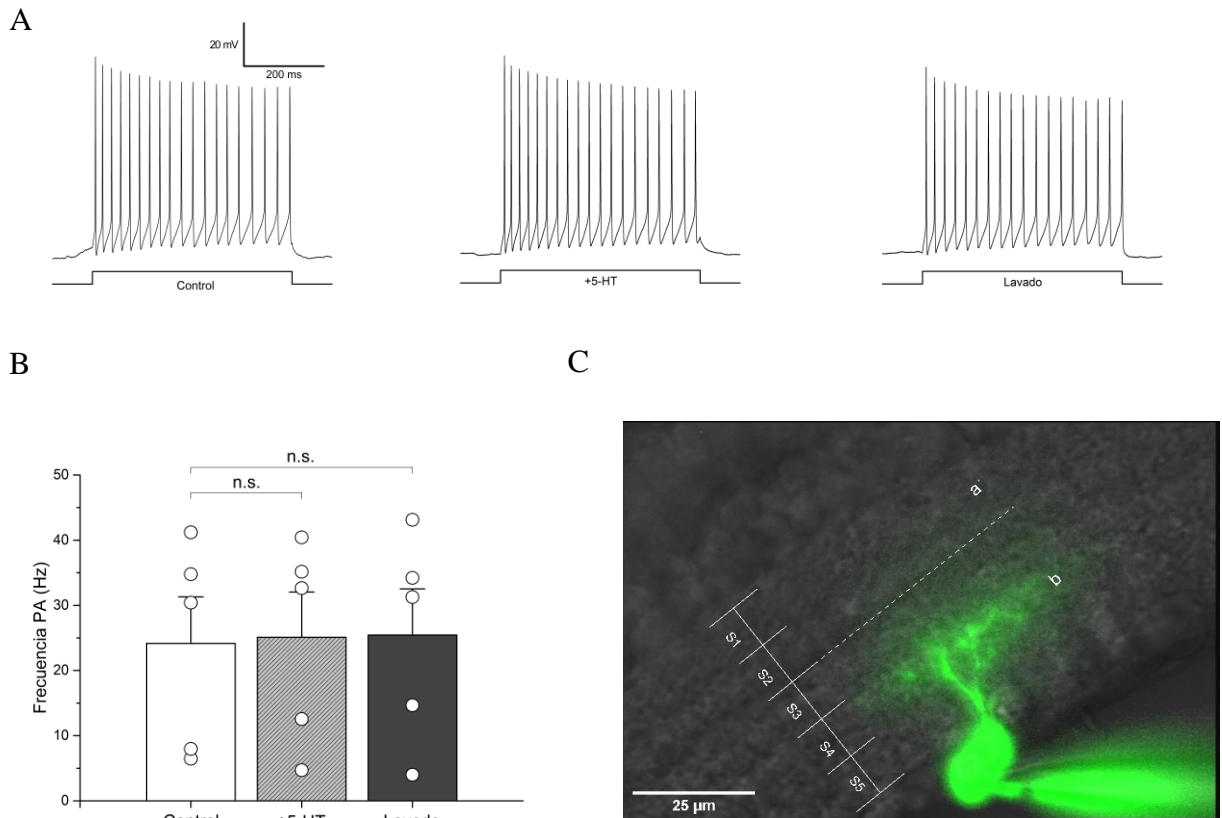


Figura 5.2. Efecto de la aplicación exógena de 5-HT sobre la frecuencia de disparo de potenciales de acción evocados en RGCs tipo ON. **A**, Trazados representativos de PA evocados por un pulso despolarizante (50 pA de amplitud y 500 ms de duración) antes, durante y después de la aplicación de 5-HT (10 μM) por 10 minutos. **B**, Gráfico promedio de frecuencia de disparo de PA (en Hz) en las tres condiciones. n.s. representa que no hay diferencia significativa entre las condiciones evaluadas. En el gráfico, las barras representan el promedio más el error estándar de la media, y los círculos el valor individual por cada célula registrada. **C**, Fotomicrografía representativa de la RGC del tipo ON con estratificación en la sublamina b. Barra en blanco = escala de 25 μm.

5.2. LA 5-HT DISMINUYE LA AMPLITUD DE LOS POTENCIALES DE ACCIÓN EN LAS RGCs DEL TIPO OFF PERO NO EN LAS RGCs DEL TIPO ON

Para estudiar si además de la reducción en la frecuencia de los potenciales de acción evocados, la 5-HT puede modificar la forma del potencial de acción, se midieron parámetros de amplitud, FWHM, tiempo de despolarización y tiempo de caída del PA. Todos estos parámetros fueron medidos en el primer PA evocado por un estímulo de 50 pA por 500 ms, y se comparó estas mediciones en 2 condiciones, control y durante la aplicación de 5-HT en RGC OFF (Figura 5.3) y RGC ON (Figura 5.4). No se realizó la medición de estos parámetros durante el lavado de la droga dado que la cantidad de PA en RGC OFF disminuyeron significativamente durante esta condición, imposibilitando la correcta medición en todas las células registradas.

La amplitud de los PA evocados en las RGC de tipo OFF disminuyó significativamente durante la aplicación de 5-HT desde 72.26 ± 3.33 mV hasta 58.68 ± 3.24 mV ($n = 6$, $p = 0.0023$, Figura 5.3A). Sin embargo, este efecto no fue replicado en las RGC del tipo ON (figura 5.4A), las cuales no presentaron cambios significativos durante la aplicación de la 5-HT (control: 71.70 ± 9.42 mV vs 5-HT: 66.16 ± 9.77 mV, $n = 5$, $p = 0.058$). Nuevamente podemos observar que el efecto de la 5-HT sobre la excitabilidad no es compartido por todas las RGC, afectando específicamente a las RGC del tipo OFF pero no a las RGC ON. Por otro lado, cuando se analizó el ancho del PA (o FWHM) en RGC OFF no se observaron cambios significativos entre la condición control (1.75 ± 0.25 ms, $n = 6$) y durante la aplicación de 5-HT (2.27 ± 0.45 ms, $n = 6$, $p = 0.26$, Figura 5.3B). Esto fue replicado en las RGC ON, las cuales tampoco presentaron cambios en el FWHM del PA durante la aplicación de 5-HT respecto al control (Control: 1.28 ± 0.27 ms vs 5-HT: 1.56 ± 0.39 ms, $n = 5$, $p = 0.10$, Figura 4B).

Al igual que el ancho del PA, el tiempo de despolarización del PA y el tiempo de caída del PA, no fueron afectados de manera significativa durante la aplicación de 5-HT en las RGC de tipo OFF (Figura 5.3C, D) y en las RGC del tipo ON (Figura 5.4C, D). El tiempo de despolarización

del PA en RGC del tipo OFF fue de 20 ± 2.99 ms en condición control comparado a los 15.04 ± 3.77 ms durante la presencia de 5-HT ($n = 6$; $p = 0.089$; Figura 5.3C). Por su parte, en las RGC del tipo ON el tiempo de despolarización fue de 3.35 ± 0.33 ms en condiciones controles comparada a los 2.89 ± 0.51 ms ($n = 4$; $p = 0.17$; Figura 5.4C) observado en la presencia de 5-HT. En tanto, el tiempo de caída del PA en RGC OFF fue de 1.26 ± 0.18 ms en condiciones controles comparado a los 1.85 ± 0.52 ms ($n = 6$; $p = 0.17$; Figura 5.3D) en la presencia de 5-HT. Para las RGC del tipo ON el tiempo de caída del PA fue de 0.80 ± 0.12 ms en condiciones controles, mientras que en la presencia de 5-HT el tiempo de caída fue de 0.90 ± 0.12 ms ($n = 4$; $p = 0.35$; Figura 5.4D).

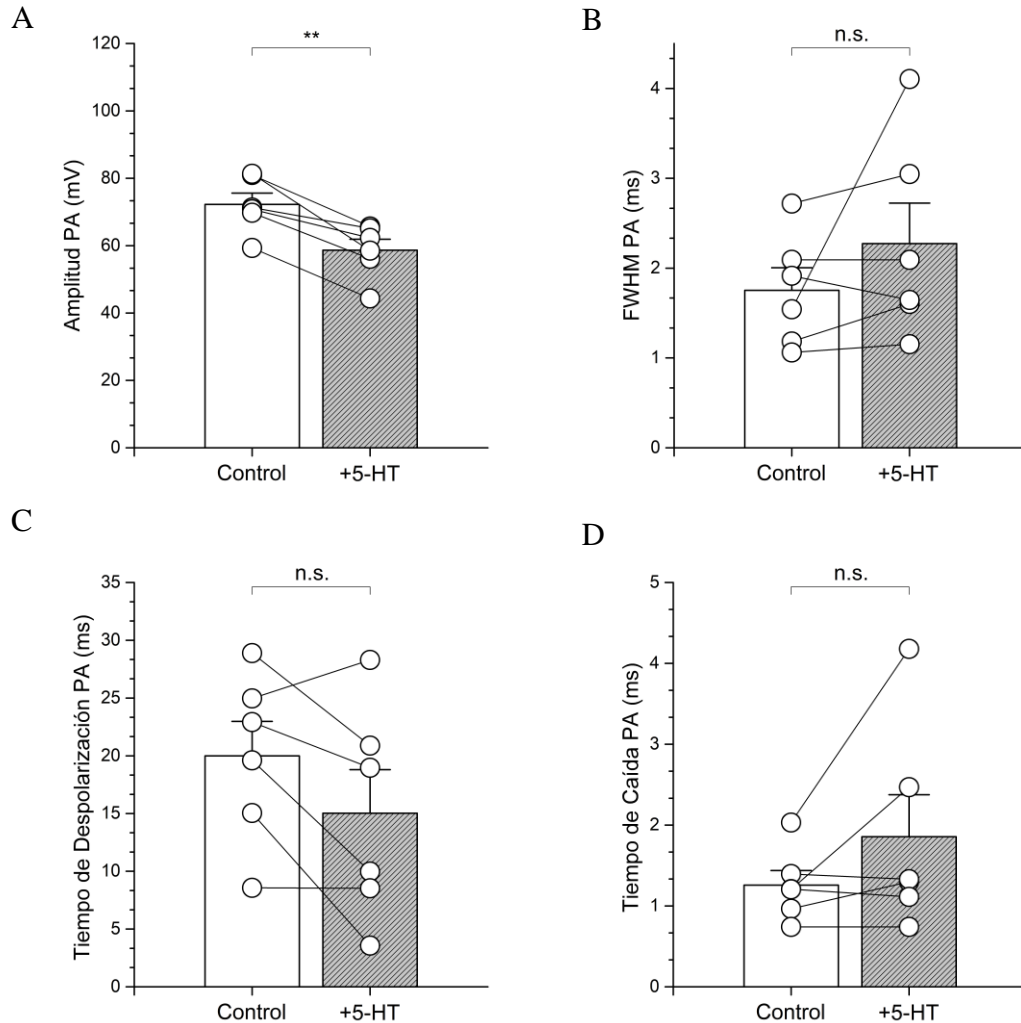


Figura 5.3. Efecto de la aplicación exógena de 5-HT sobre el primer potencial de acción evocado en RGC tipo OFF. **A**, Gráfico de amplitud (en milivolts, mV) antes y durante la aplicación de 5-HT (10 μ M). **B**, Gráfico de la FWHM antes y durante la aplicación de 5-HT. **C**, Gráfico del tiempo que demora el primer potencial de acción en recorrer desde el 10% al 90% del peak, antes y durante la aplicación de 5-HT. **D**, Gráfico del tiempo que demora el PA en caer un 37% desde el peak, antes y durante la aplicación de 5-HT. En los gráficos los asteriscos representan diferencias significativas evaluadas mediante Test T pareado. ** = $p < 0.01$, y n.s. representa comparaciones que no fueron significativas entre las condiciones evaluadas. Cada barra en los gráficos representa el promedio y el error estándar de la media (SEM) y los círculos representan el valor individual por célula.

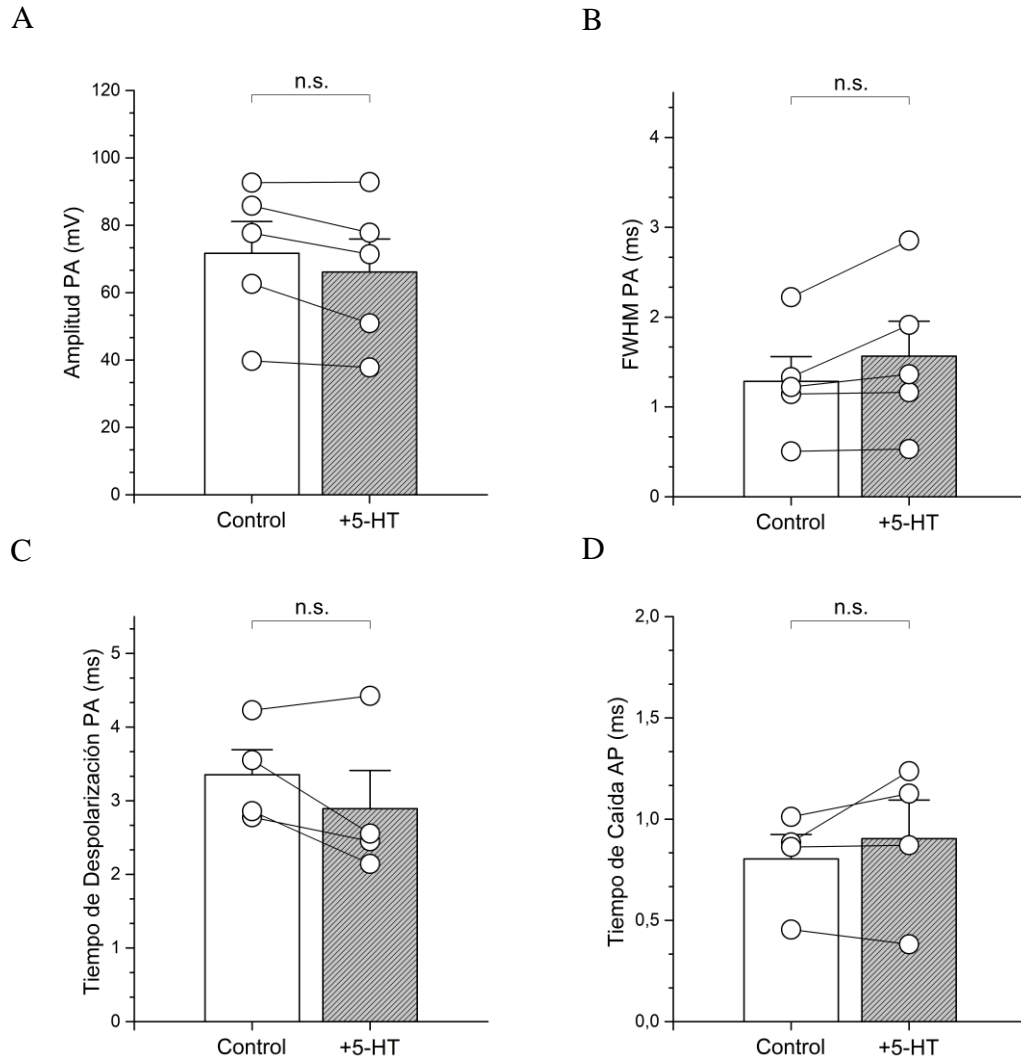


Figura 5.4. Efecto de la aplicación exógena de 5-HT sobre el primer potencial de acción evocado en RGC tipo ON. **A**, Gráfico de amplitud (en milivolts, mV) antes y durante la aplicación de 5-HT (10 μ M). **B**, Gráfico de la FWHM antes y durante la aplicación de 5-HT 10 μ M. **C**, Gráfico del tiempo que demora el primer PA en recorrer desde el 10% al 90% del peak, antes y durante la aplicación de 5-HT. **D**, Gráfico del tiempo que demora el potencial de acción en caer al 37% antes y durante la aplicación de 5-HT. En los gráficos, n.s. representa comparaciones que no fueron significativas entre las condiciones evaluadas. Cada barra en los gráficos representa el promedio y el error estándar de la media (SEM) y los círculos representan el valor individual por célula.

5.3. LA 5-HT DESPOLARIZA LA MEMBRANA DE LAS RGCs OFF

Para evaluar si la aplicación exógena de 5-HT puede alterar el potencial de membrana en reposo en las RGC, se analizó el voltaje de membrana a través del tiempo de todas las RGC registradas en este estudio, lo que representa el potencial de membrana en reposo de cada una de las células y su variación en el tiempo. Luego de 10 minutos de registro estable se aplicó 5-HT por 10 minutos y posteriormente se lavó por otros 10 minutos. Se comparó el potencial de reposo en las 3 condiciones, control, durante la aplicación de 5-HT y durante el lavado de la droga. Como se muestra en la Figura 5.5, la 5-HT modificó el potencial de membrana en reposo de las RGC OFF, pero no de las RGCs del tipo ON (Figura 5.5A, B) produciendo una despolarización del potencial de membrana hasta -53.98 ± 2.16 mV en comparación a la condición control que fue de -63.86 ± 1.71 mV ($n = 9$, $p = 0.0071$). Este efecto de la 5-HT se mantuvo e incluso aumentó durante el lavado de la droga hasta -48.68 ± 2.24 mV respecto de la condición control ($n = 9$, $p = 0.000068$).

A diferencia de lo ocurrido con las RGC OFF, la aplicación de 5-HT no produjo una variación significativa del potencial de membrana al comparar la condición control (-58.05 ± 0.87 mV) respecto a la aplicación de 5-HT (-57.70 ± 1.56 mV; $n = 9$, $p=1$) o durante el lavado (-56.32 ± 1.63 mV, $n = 9$, $p=1$) demostrando una vez más que la 5-HT ejerce efectos específicos sobre la excitabilidad de las RGCs del tipo OFF pero no sobre las RGCs del tipo ON (Figura 5.5C).

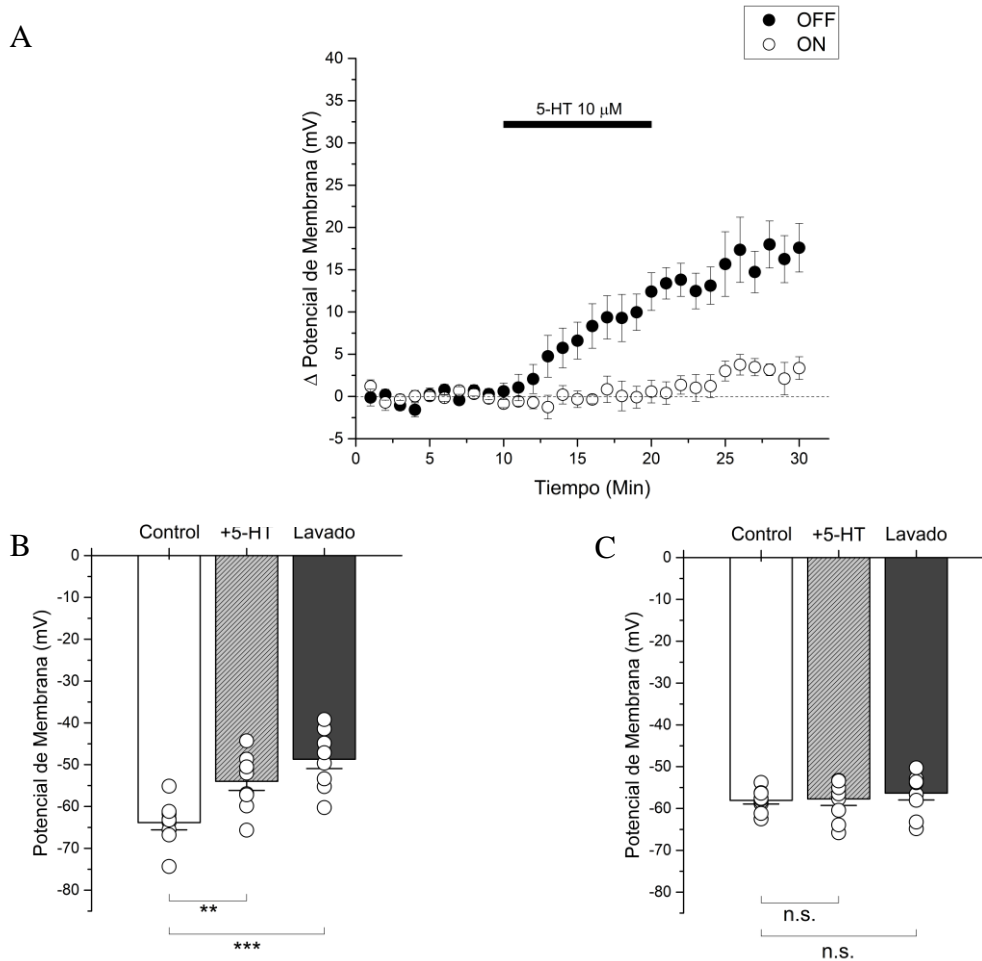


Figura 5.5. Efecto diferencial de la aplicación exógena de 5-HT sobre el potencial de membrana en reposo en las RGC del tipo ON y tipo OFF. **A**, Gráfico de variación del voltaje de membrana (Δ potencial de membrana) a través del tiempo en RGC del tipo ON (blanco) y las RGC del tipo OFF (negro). La barra negra en la parte superior indica el momento de la aplicación de 5-HT (10 μ M) la cual se extendió durante 10 minutos para luego ser lavada del medio extracelular. **B**, Gráfico del potencial de membrana en reposo antes, durante y después de la aplicación de 5-HT en las RGC del tipo OFF. **C**, Gráfico del potencial de membrana en reposo antes, durante y después de la aplicación de 5-HT en las RGC del tipo ON. Los asteriscos representan diferencias significativas entre las condiciones evaluadas mediante un test ANOVA de una vía y post-hoc Bonferroni. ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, y n.s. demuestra que no hay diferencias significativas entre condiciones. Cada barra representa el promedio y el error estándar de la media, los círculos representan el valor individual de cada célula.

5.4. LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR 5-HT_{2A} DESPOLARIZA LA MEMBRANA DE LAS RGCs DEL TIPO OFF

Para determinar si los receptores de 5-HT_{2A} son los encargados de mediar los efectos producidos por la 5-HT, se procedió a utilizar TCB-2, un agonista específico de estos receptores. La aplicación de TCB-2 a una concentración de 1 μ M durante 10 minutos provocó una despolarización del potencial de reposo de las RGC del tipo OFF de aproximadamente 10 mV, desde una condición control de -61.45 ± 1.15 mV hasta -51.64 ± 2.63 mV en la presencia de este agonista ($n = 3$, $p = 0.04$). La despolarización desencadenada por la aplicación de TCB-2, al igual que lo observado con la 5-HT se acentúa durante el lavado (-39.92 ± 2.10 , $n = 3$, $p = 0.000094$; Figura 5.6C). Por otro lado, el efecto observado por TCB-2 es también específico para el tipo de RGC OFF, ya que la aplicación sobre las RGC del tipo ON no genera cambios significativos en el potencial de membrana (Control: -64.76 ± 2.23 mV vs TCB-2: -64.25 ± 2.42 mV, $n = 4$, $p = 1$), lo que se mantuvo durante el lavado de la droga (-61.99 ± 2.63 mV, $n = 4$, $p = 1$; Figura 5.7C).

Por otro lado, la frecuencia de potenciales de acción evocados no presento un cambio significativo durante la aplicación de TCB-2 en las RGC OFF (Figura 5.6 A,B), siendo 13.42 ± 6.11 Hz en condiciones controles y 11.55 ± 5.21 Hz ($n = 3$, $p = 1$) en la presencia de TCB-2. Lo mismo sucedió en este tipo celular durante el lavado (0.94 ± 0.45 Hz, $n = 3$, $p = 0.31$) en comparación al control. Por su parte, las RGC del tipo ON (Figura 5.7A,B) no sufrieron cambios significativos durante la aplicación de TCB-2 (Control: 24.11 ± 1.98 Hz vs TCB-2: 25.74 ± 2.25 Hz, $n = 4$, $p = 1$), lo que se mantuvo durante el lavado de este agonista (25.24 ± 2.78 Hz, $n = 4$, $p = 1$ vs control). De este modo, nuestros resultados nos indican que la 5-HT, probablemente mediante la activación de receptores 5-HT_{2A} regula las propiedades intrínsecas de las RGC del tipo OFF.

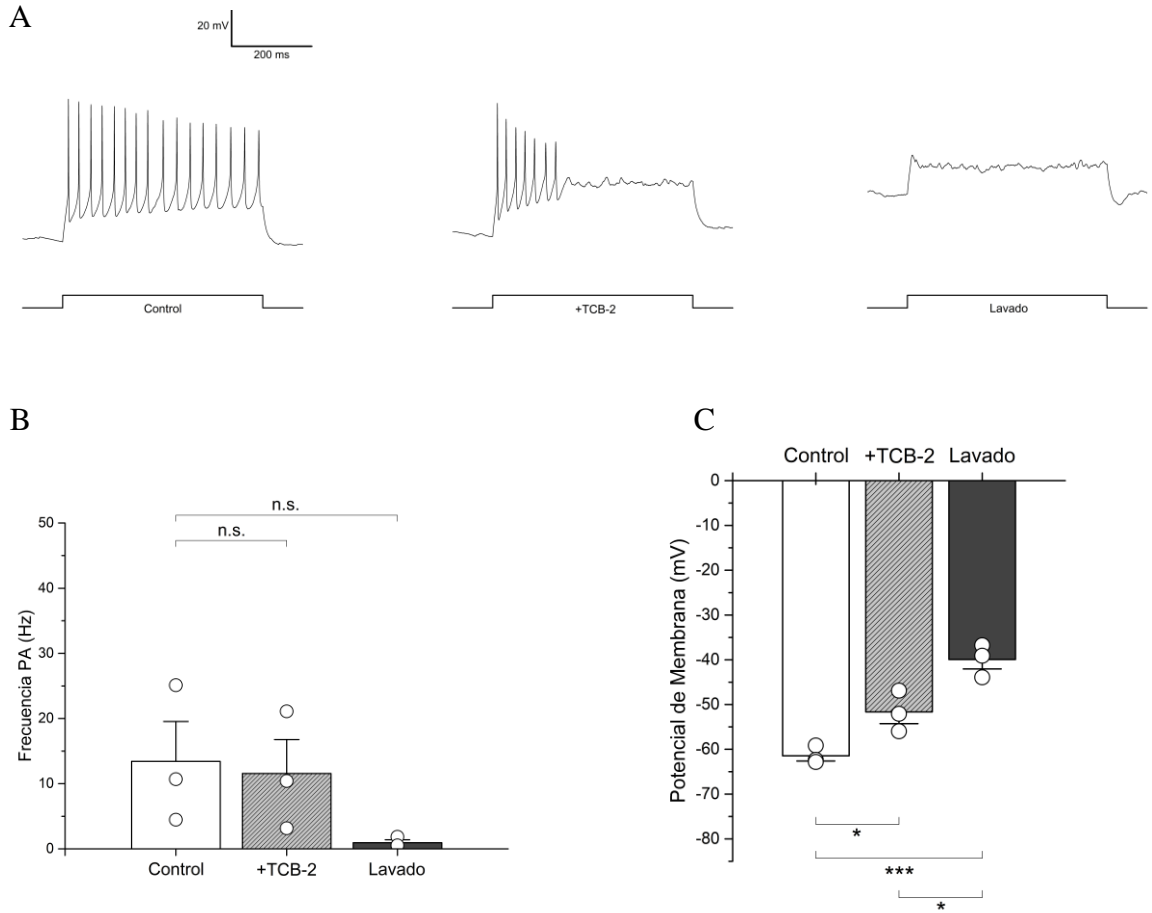


Figura 5.6. Efecto diferencial de la aplicación exógena de TCB-2 ($1 \mu\text{M}$) sobre la frecuencia de potenciales de acción evocados y el potencial de membrana en reposo en las RGC del tipo OFF. **A**, Trazados representativos de PA evocados por un pulso despolarizante (50 pA , 500 ms duración) antes (izquierda), durante (centro) y después (derecha) de la aplicación de TCB-2 ($1 \mu\text{M}$) por 10 minutos. **B**, Gráfico de frecuencia de disparo de PA (en Hz) en las 3 condiciones evaluadas en las RGC del tipo OFF. **C**, Gráfico del potencial de membrana en reposo en las 3 condiciones evaluadas en las RGC del tipo OFF. Los asteriscos sobre el gráfico de barras representan diferencias significativas entre las condiciones evaluadas mediante Test ANOVA de una vía y post-hoc Bonferroni. * = $p < 0.05$, *** = $p < 0.001$, n.s. = no significativo. Cada barra representa el promedio y el error estándar de la media, y los círculos representan el valor individual de cada célula.

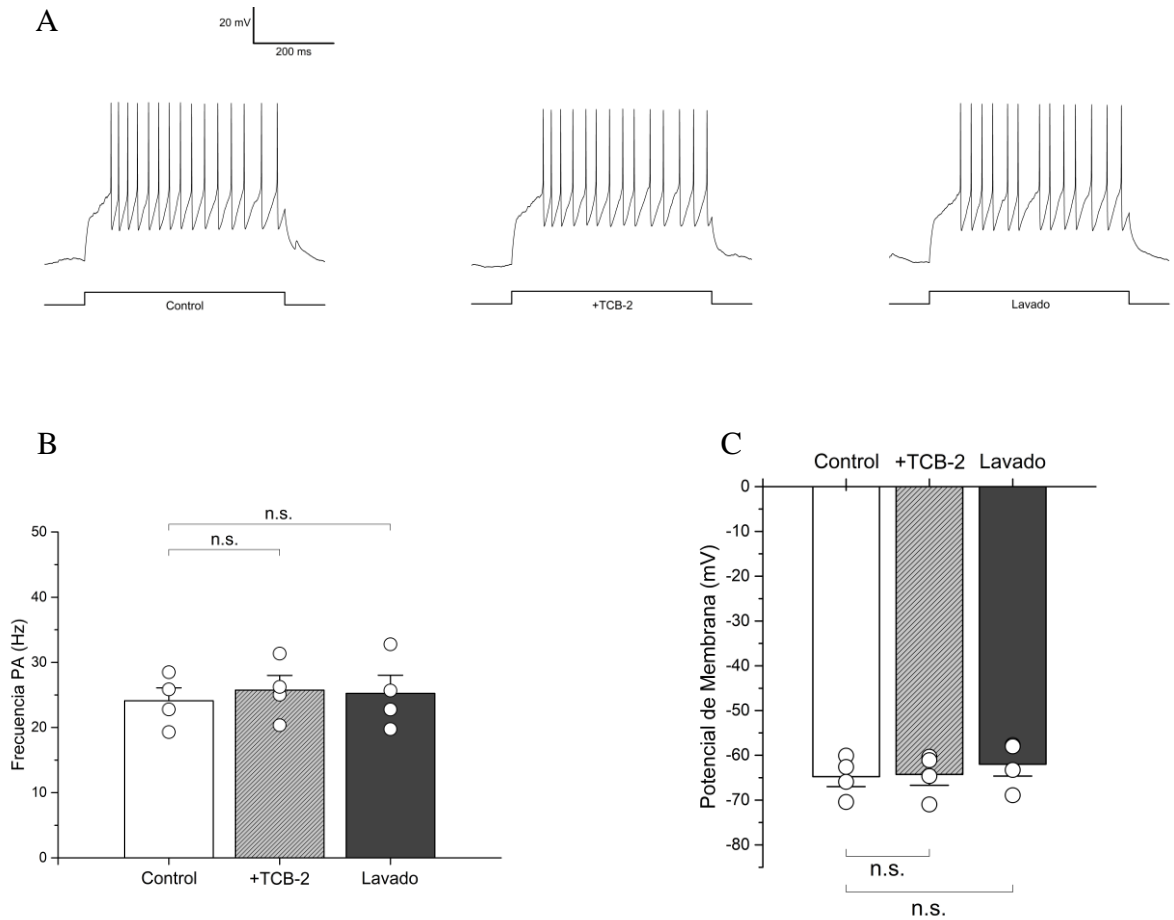


Figura 5.7. Efecto de la aplicación exógena de TCB-2 ($1 \mu\text{M}$) sobre la frecuencia de potenciales de acción evocados y el potencial de membrana en reposo en las RGC del tipo ON. **A**, Trazados representativos de PA evocados por un pulso despolarizante (50 pA , 500 ms duración) antes (izquierda), durante (centro) y después (derecha) de la aplicación de TCB-2 ($1 \mu\text{M}$) por 10 minutos. **B**, Gráfico de frecuencia de disparo de PA (en Hz) en las 3 condiciones evaluadas en las RGC del tipo ON. **C**, Gráfico del potencial de membrana en reposo en las 3 condiciones evaluadas en las RGC del tipo ON. Los asteriscos sobre los gráficos de barras representan diferencias significativas entre las condiciones, evaluadas mediante Test ANOVA de una vía; n.s. = no significativo. Cada barra representa el promedio y el error estándar de la media, y los círculos representan el valor individual de cada célula.

CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis se demostró que la aplicación exógena de 5-HT modula la excitabilidad de las RGC de manera diferencial y célula específica, siendo las RGC del tipo OFF afectadas por la 5-HT. Si bien a la fecha, no se ha demostrado fehacientemente que la 5-HT es liberada en la retina de manera endógena, los experimentos realizados sugieren que la 5-HT es capaz de producir una disminución en los PA evocados, y alterar el potencial de membrana en reposo, lo cual modificará las señales visuales de la vía OFF pero no de la vía ON que son enviadas a centros superiores del procesamiento visual. Del mismo modo, los resultados obtenidos indican que los efectos de la 5-HT sobre el potencial de membrana en reposo son replicados tras la activación de receptores de 5-HT_{2A}, ya que la aplicación de un agonista específico (TCB-2) genera los mismos efectos que la aplicación exógena de 5-HT sobre el potencial de membrana. El presente estudio demuestra por primera vez que la 5-HT puede generar un efecto en las propiedades intrínsecas de las RGC en la retina de mamíferos, ayudando al entendimiento del papel de este neurotransmisor en la función visual. En su conjunto los resultados obtenidos sumados a la información publicada nos dan cuenta de una gran diversidad de fenómenos fisiológicos por los cuales la 5-HT pudiera estar regulando el procesamiento e integración de la función visual.

6.1. LA 5-HT MODULA EL POTENCIAL DE ACCIÓN EN LAS RGC DEL TIPO OFF

Como se mostró en los resultados, la aplicación exógena de 5-HT provocó una disminución significativa en la frecuencia y amplitud de los PA evocados en RGC OFF. Dado que la fase de despolarización activa y la amplitud del PA están a cargo de los canales de Na⁺ activados por voltaje (2), es posible que la 5-HT disminuya la frecuencia y amplitud del PA mediante una modulación de estos canales de Na⁺ como se ha observado en otras zonas del SNC (62). Además, se sabe que los canales de Na⁺ expresan una inactivación rápida a potenciales despolarizantes (84),

lo cual puede ser regulado por la 5-HT (85). De hecho, en diversas zonas del cerebro, se ha demostrado que la activación de enzimas como la PLC y PKC, dos señales intracelulares río abajo de receptores de 5-HT₂ son capaces de fosforilar ciertas regiones de la estructura molecular de los canales de Na⁺, y de esta manera aumentar su inactivación, reduciendo así la disponibilidad de estos canales (62,86). Por ejemplo, en la corteza prefrontal, se ha demostrado que la activación del receptor 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} disminuye las corrientes de sodio mediante la activación de las enzimas PLC-PKC (62). Interesantemente, otros sistemas de neurotransmisores presentes en la retina de mamíferos como la dopamina (amina biogénica como la 5-HT) mediante la activación de su receptor D1 también son capaces de reducir la excitabilidad de las RGC mediante mecanismos que involucran la activación de PKA y la reducción de las corrientes de Na⁺ (87,88). Si bien esta posibilidad necesita ser evaluada en las RGCs del tipo OFF, otros potenciales mecanismos no pueden ser eliminados. Por ejemplo, otra posibilidad que explique la disminución de PA podría estar relacionado a la despolarización del V_{rep} provocado por la 5-HT, se sabe que los canales de Na⁺ reducen su disponibilidad ante potenciales más despolarizados (>95 % a 0 mV), proceso que involucra la inactivación de estos canales (84), es por ello que también es posible que dentro de la disminución de PA evidenciados ante la aplicación de 5-HT, exista un efecto indirecto de la despolarización sostenida del V_{rep} y no dependa directamente de una activación y cascada de señalización de un 5-HTR en particular. Nuevos experimentos que involucren la fijación del voltaje de membrana a un potencial fisiológico (Ej. -60) o el uso de antagonistas de las cascadas de señalización al interior de las neuronas podrían corroborar o refutar esa posibilidad. Si aun fijando el voltaje de membrana una disminución de los PA fuera observado, se podría asegurar que este efecto es una acción directa de la activación de 5-HTR y no una consecuencia de la despolarización del potencial de reposo. Del mismo modo, si al antagonizar la señal de PKA/PKC no se observaran cambios en la frecuencia y amplitud de los PA, nos darían cuenta de la participación de estas enzimas en los efectos de la 5-HT sobre la excitabilidad de las RGCs del tipo OFF. Estudios futuros, de seguro, podrán responder estas interrogantes.

6.2. LA 5-HT REGULA EL POTENCIAL DE MEMBRANA EN REPOSO DE LAS RGC DEL TIPO OFF

En este estudio además se demostró que la aplicación exógena de 5-HT modifica el potencial de membrana en reposo de manera célula específica, afectando solo las RGC OFF. Diversos mecanismos desencadenados a través de la activación de receptores de 5-HT han demostrado la capacidad de modular el potencial de membrana en el SNC. Por ejemplo, en la amígdala lateral, neuronas principales responden a la 5-HT con una despolarización mediada por la activación del receptor 5-HT_{2C}, proceso mediado por la activación de canales catiónicos TRPC y la inhibición de canales de potasio GIRK (74). Del mismo modo, neuronas del núcleo tuberomamilar del hipotálamo también presentan una despolarización de la membrana ante la exposición a la 5-HT, fenómeno relacionado también a la activación del receptor 5-HT_{2C} (77), sin embargo, a diferencia del fenómeno visto en la amígdala lateral que es mediado por la inhibición de canales de K⁺, el mecanismo que desencadena la activación de este receptor de 5-HT recae en la activación de un intercambiador de Na⁺/Ca²⁺ (77). Por otro lado, en neuronas sensoriales, el receptor 5-HT_{2C} también es capaz de generar una despolarización del potencial de membrana a través de la modulación de canales de cloro activados por Ca²⁺ (78). Por su parte, en motoneuronas del nervio hipogloso la 5-HT mediante mecanismos que involucran la inhibición de TASK-1, un tipo de canal de K⁺, regula el potencial de membrana (89). En el núcleo accumbens, la 5-HT a través de receptores 5-HT₂ disminuye las conductancias de K⁺ y despolariza la membrana neuronal (76). Otros receptores de 5-HT también han sido demostrados que alteran el potencial de membrana neuronal, como los receptores 5-HT₇ (90). Mientras los resultados de este estudio indican que los receptores de 5-HT₂ están involucrados en este cambio del potencial de membrana (Figura 5.6), los mecanismos celulares por los cuales ellos modifican las RGCs del tipo OFF aún se desconocen.

6.3. ROL DE LA 5-HT EN EL PROCESAMIENTO VISUAL

Mientras el procesamiento visual ocurre en varios estadios de la retina, en particular en la interacción entre las células bipolares, amacrinas y ganglionares en la CPI, los resultados obtenidos nos sugieren que los efectos de la 5-HT probablemente estén involucrados en un mecanismo de adaptación a distintos estímulos lumínicos (ON vs OFF). De ocurrir una liberación endógena de 5-HT sobre las RGC OFF provocaría que estas últimas se volvieran menos excitables de acuerdo a los resultados de este trabajo, una forma de adaptación a los estímulos lumínicos de las RGC que se ha demostrado con otros neurotransmisores como la dopamina. Si bien los efectos de la dopamina en la retina de mamíferos son diversos, el resultado funcional es un aumento del flujo de información a través de los circuitos de cono y una disminución del flujo de señal a través de los circuitos de bastones (91). Dado que los efectos de la 5-HT son célula específica principalmente sobre RGCs del tipo OFF quienes regulan el flujo de información de la vía de los conos, sería importante determinar en un futuro si estos efectos dependen de la adaptación de la retina a condiciones diversas de luminosidad. Mientras en este trabajo se realizó en condiciones fotópicas (adaptación a la luz), evaluar los efectos de la 5-HT y en particular del receptor 5-HT₂ en condiciones escotópicas o de oscuridad son necesarios para comprender el papel funcional de la 5-HT en la modulación de la señal visual. Del mismo modo, se ha demostrado que la expresión de receptores del sistema serotoninérgico puede verse modificada en relación a la hora del día, por lo que también es posible que estos procesos varíen o radiquen su importancia en la sensibilidad y adaptación de las RGC a las respuestas lumínicas relacionadas de alguna forma al ciclo diurno/nocturno. De este modo, nuevos experimentos son necesarios para comprender el papel fisiológico de la 5-HT en la modulación de la excitabilidad de las RGC del tipo OFF, y como esta modulación influyen en la integración y envío de señales visuales de los conos a los centros superiores del procesamiento visual.

Por último, recientemente se ha demostrado que la 5-HT podría ser importante para la reducción de la excitotoxicidad inducida en algunos procesos patológicos en modelos murinos de neurodegeneración de la retina, en los cuales la activación de algunos de los receptores de 5-HT provoca una mayor resistencia de las neuronas retinianas a ser degeneradas. Si bien, los resultados

de este estudio demuestran una disminución de la excitabilidad a nivel de las RGC, esta reducción está acompañada de una fuerte despolarización del potencial de reposo, un fenómeno que ocurre e incrementa la degeneración neuronal en procesos patológicos como la llamada “despolarización anóxica” ocurrida durante un ataque cerebrovascular o una isquemia cerebral (92). Si los efectos de la 5-HT observados en este trabajo están involucrados en algunos procesos patológicos de la retina requiere una nueva investigación.

CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en este trabajo podemos concluir que:

1. La 5-HT altera la excitabilidad de las RGCs en un modo célula específica afectando las del tipo OFF pero no las del tipo ON.
2. La 5-HT podría estar activando los receptores de 5-HT_{2A}, presentes en las RGCs del tipo OFF, para generar la despolarización del potencial de reposo.
3. La modulación específica de la 5-HT sobre un tipo neuronal sugiere que este neuromodulador regula el flujo de información de la vía de conos disminuyendo la excitabilidad de las RGCs del tipo OFF.
4. Mayores estudios serán necesarios para dilucidar el significado de esta modulación delimitada a una vía específica del procesamiento visual al igual que los posibles efectos de su perturbación.

CAPÍTULO 8. ANEXOS

I. INFORMACIÓN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

- a. **Nombre del proyecto:** “Role of endocannabinoid signaling in retinal synaptic function”
- b. **Institución:** Universidad de Valparaíso
- c. **Investigador a cargo:** Dr. Andrés Eduardo Chávez Navarrete
- d. **Financiamiento:** Concurso FONDECYT Regular, proyecto 1151091

Información sobre el uso, publicación y propiedad intelectual de los datos: El alcance de este proyecto está regulado por las bases públicas del concurso FONDECYT Regular. La propiedad intelectual de la información generada por el Proyecto y de los resultados del mismo, pertenecerá al Grupo de Investigación del Proyecto y deberá ser publicada en Revistas indexadas (ISI) y en Congresos. El proyecto Fondecyt que permitió el desarrollo de esta tesis cuenta con la aprobación del Comité de Bioética para estudios en animales de la Universidad de Valparaíso.

CAPÍTULO 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Nestler EJ, Hyman SE, Holtzman DM, Malenka RC. Neurofarmacología molecular. Fundamentos de neurociencia clínica. 3rd ed. Madrid: McGraw-Hill; 2017.
2. Kandel ER, Jessell TM, Schwartz JH, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ. Principles of Neural Science, Fifth Edition [Internet]. McGraw-Hill Education; 2013. Available from: <https://books.google.cl/books?id=s64z-LdAIsEC>
3. Millan MJ, Marin P, Bockaert J, Mannoury la Cour C. Signaling at G-protein-coupled serotonin receptors: recent advances and future research directions. Trends Pharmacol Sci. 2008;29(9):454–64.
4. Meltzer HY, Li Z, Kaneda Y, Ichikawa J. Serotonin receptors: Their key role in drugs to treat schizophrenia. Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry. 2003;27(7):1159–72.
5. World Health Organization. Depression and other common mental disorders: global health estimates. Geneva World Heal Organ [Internet]. 2017;1–24. Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/254610/1/WHO-MSD-MER-2017.2-eng.pdf>
6. D. Ogilvie, Battersby S, Fink G, a.J Harmar, Goodwin GM, Bubb VJ, et al. Polymorphism in serotonin transporter gene associated with susceptibility to major depression. Lancet. 1996;347(9003):731–3.
7. Zhang X, Gainetdinov RR, Beaulieu JM, Sotnikova TD, Burch LH, Williams RB, et al. Loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression. Neuron. 2005;45(1):11–6.
8. McMahon FJ, Buervenich S, Charney D, Lipsky R, Rush AJ, Wilson AF, et al. Variation in the gene encoding the serotonin 2A receptor is associated with outcome of antidepressant treatment. Am J Hum Genet [Internet]. 2006;78(5):804–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16642436> http://ac.els-cdn.com/S0002929707638154/1-s2.0-S0002929707638154-main.pdf?_tid=aee4aa0e-f406-11e4-b548-

00000aacb362&acdnat=1430927206_ea6754f62f9aef67389b75dddb6bf485

9. Jainer AK, Kamatchi R, Marzanski M, Somashekar B. Current Advances in the Treatment of Major Depression: Shift Towards Receptor Specific Drugs. In: Kamatchi R, editor. Rijeka: IntechOpen; 2013. p. Ch. 12. Available from: <https://doi.org/10.5772/52298>
10. Zhang T, Huang L, Zhang L, Tan M, Pu M. ON and OFF retinal ganglion cells differentially regulate serotonergic and GABAergic activity in the dorsal raphe nucleus. *Sci Rep* [Internet]. 2016;1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep26060>
11. Villar MJ, Vitale ML, Parisi MN. DORSAL RAPHE SEROTONERGIC PROJECTION TO THE RETINA . A COMBINED PEROXIDASE TRACING-NEUROCHEMICAL / HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY STUDY IN THE RAT. *Neuroscience*. 1987;22(2):681–6.
12. Hannon J, Hoyer D. Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res*. 2008;195(1):198–213.
13. Penington BYNJ, Kellyt JS, Fox AP. *Pharmacological and Physiological Sciences*, The University of Chicago, 947. 1993;387–405.
14. Bayliss DA, Li Y-W, Talley EM. Effects of Serotonin on Caudal Raphe Neurons: Activation of an Inwardly Rectifying Potassium Conductance. *J Neurophysiol* [Internet]. 1997;77(3):1349–61. Available from: <https://doi.org/10.1152/jn.1997.77.3.1349>
15. Cardenas CG, Mar LP Del, Scroggs RS. Two Parallel Signaling Pathways Couple 5HT1A Receptors to N- and L-Type Calcium Channels in C-Like Rat Dorsal Root Ganglion Cells. *J Neurophysiol* [Internet]. 1997;77(6):3284–96. Available from: <https://doi.org/10.1152/jn.1997.77.6.3284>
16. Leysen JE. 5-HT 2 Receptors. *Curr Drug Targets - CNS Neurol Disord*. 2004;3:11–26.
17. R.W. R. *The First Steps in Seeing*. United States: Sinauer Associates; 1999. 550 p.
18. Masland RH. The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci* [Internet]. 2001;4:877. Available from: <https://doi.org/10.1038/nn0901-877>
19. Wu SM. Synaptic Transmission in the Outer Retina. *Annu Rev Physiol* [Internet]. 1994;56(1):141–68. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.56.030194.001041>
20. Demb JB, Singer JH. Functional Circuitry of the Retina. *Annu Rev Vis Sci* [Internet]. 2015;1(1):263–89. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-vision-082114-035334>

21. Malmfors T. Evidence of Adrenergic Neurons with Synaptic Terminals in the Retina of Rats Demonstrated with Fluorescence and Electron Microscopy. *Acta Physiol Scand* [Internet]. 1963;58(1):99–100. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1963.tb02632.x>
22. Osborne NN, Nesselhut T, Nicholas DA, Patel S, Cuello AC. Serotonin-Containing Neurones in Vertebrate Retinas. *J Neurochem* [Internet]. 1982;39(6):1519–28. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1982.tb07984.x>
23. Ghai K, Zelinka C, Fischer AJ. Serotonin released from amacrine neurons is scavenged and degraded in bipolar neurons in the retina. *J Neurochem* [Internet]. 2009 Oct;111(1):1–14. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-4159.2009.06270.x>
24. Schuette E, Chappell RL. Excitatory Amino Acids and Serotonin Uptake Blockers Reveal two Physiologically Distinct Serotonin Systems in the Retina of the Skate. *Int J Neurosci* [Internet]. 1998;95(1–2):115–32. Available from: <https://doi.org/10.3109/00207459809000655>
25. Zhu B, Gábriel R, Straznicky C. Serotonin synthesis and accumulation by neurons of the anuran retina. *Vis Neurosci* [Internet]. 1992;9(3–4):377–88. Available from: <https://www.cambridge.org/core/article/serotonin-synthesis-and-accumulation-by-neurons-of-the-anuran-retina/92E735136FE950E8C3606127C870BF17>
26. Pérez-León JA, Sarabia G, Miledi R, García-Alcocer G. Distribution of 5-hydroxytryptamine 2C receptor mRNA in rat retina. *Mol Brain Res*. 2004;125(1–2):140–2.
27. Pootanakit K, Prior KJ, Hunter DD, Brunken WJ. 5-HT_{2a} receptors in the rabbit retina: Potential presynaptic modulators. *Vis Neurosci*. 1999;16(2):221–30.
28. Lu Q, Ivanova E, Pan Z. CHARACTERIZATION OF GREEN FLUORESCENT PROTEIN – EXPRESSING RETINAL CONE BIPOLAR CELLS IN A 5-HYDROXYTRYPTAMINE RECEPTOR 2a TRANSGENIC MOUSE LINE. *Neuroscience* [Internet]. 2009;163(2):662–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.07.002>
29. Trakhtenberg EF, Pita-Thomas W, Fernandez SG, Patel KH, Venugopalan P, Shechter JM, et al. Serotonin receptor 2C regulates neurite growth and is necessary for normal retinal processing of visual information. *Dev Neurobiol*. 2017;77(4):419–37.
30. Chidlow G, Corre SLE, Osborne NN. LOCALIZATION OF 5-HYDROXYTRYPTAMINE_{1A} AND 5-HYDROXYTRYPTAMINE₇ RECEPTORS IN

- RABBIT OCULAR AND BRAIN TISSUES. *Neuroscience*. 1998;87(3):675–89.
31. Brunken WJ, Jin X-T. A role for 5HT₃ receptors in visual processing in the mammalian retina. *Vis Neurosci* [Internet]. 1993;10(3):511–22. Available from: <https://www.cambridge.org/core/article/role-for-5ht3-receptors-in-visual-processing-in-the-mammalian-retina/9EA5B28D356C3D4640979E5F202D01D3>
 32. Osborne NN, Ghazi H. 5-HT_{1A} RECEPTORS POSITIVELY COUPLED TO C-AMP FORMATION IN THE RABBIT RETINA. *Neurochem Int*. 1991;19(4).
 33. Boschert U, Amara DA, Segut L, Hen R. THE MOUSE 5-HYDROXYTRYPTAMINE 1B RECEPTOR IS LOCALIZED PREDOMINANTLY ON AXON TERMINALS. *Neuroscience*. 1994;58:167–82.
 34. Pootanakit K, Brunken WJ. 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptor expression in the mammalian retina. *Brain Res* [Internet]. 2000;875(1):152–6. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899300025531>
 35. Jin XTAO, Brunken WJ. Serotonin receptors modulate rod signals: A neuropharmacological comparison of light- and dark-adapted retinas. *Vis Neurosci*. 1998;15(5):891–902.
 36. Brunken WJ, Daw NW. The effects of serotonin agonists and antagonists on the response properties of complex ganglion cells in the rabbit 's retina. *Vis Neurosci*. 1988;1(2):181–8.
 37. Shen H, Semba K. A direct retinal projection to the dorsal raphe nucleus in the rat. *Brain Res*. 1994;635:159–68.
 38. Reuss S, Fuchs E. Anterograde tracing of retinal afferents to the tree shrew hypothalamus and raphe. *Brain Res*. 2000;874(1):66–74.
 39. Fite K V, Janusonis S, Foote W, Bengston L. Retinal Afferents to the Dorsal Raphe Nucleus in Rats and Mongolian Gerbils. *J Comp Neurol*. 1999;414:469–84.
 40. Dhande OS, Stafford BK, Lim J-HA, Huberman AD. Contributions of Retinal Ganglion Cells to Subcortical Visual Processing and Behaviors. *Annu Rev Vis Sci* [Internet]. 2015;1(1):291–328. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-vision-082114-035502>
 41. Pennesi ME, Stoddard JW, Michaels K V., Blum ED, Maricle A, Francis PJ. Expression and Localization of Serotonin Receptors in the Mouse Retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.

- 2012;53(14):6547.
42. Masson J. Serotonin in retina. *Biochimie* [Internet]. 2018; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.11.006>
 43. Pootanakit K, Brunken WJ. Identification of 5-HT_{3A} and 5-HT_{3B} receptor subunits in mammalian retinae: Potential pre-synaptic modulators of photoreceptors. *Brain Res.* 2001;896(1–2):77–85.
 44. Wassle H, Puller C, Muller F, Haverkamp S. Cone Contacts, Mosaics, and Territories of Bipolar Cells in the Mouse Retina. *J Neurosci* [Internet]. 2009;29(1):106–17. Available from: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.4442-08.2009>
 45. Shen Y, Heimel JA, Kamermans M, Peachey NS, Gregg RG, Nawy S. A Transient Receptor Potential-Like Channel Mediates Synaptic Transmission in Rod Bipolar Cells. *J Neurosci* [Internet]. 2009;29(19):6088–93. Available from: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.0132-09.2009>
 46. Morgans CW, Brown RL, Duvoisin RM. TRPM1: the endpoint of the mGluR6 signal transduction cascade in retinal ON-bipolar cells. *Bioessays* [Internet]. 2010;32(7):609–14. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20544736>
 47. Kolb H, Nelson R. The organization of photoreceptor to bipolar synapses in the outer plexiform layer BT - *Neurobiology and Clinical Aspects of the Outer Retina*. In: Djamgoz MBA, Archer SN, Vallergera S, editors. Dordrecht: Springer Netherlands; 1995. p. 273–96. Available from: https://doi.org/10.1007/978-94-011-0533-0_11
 48. Euler T, Wässle H. Immunocytochemical identification of cone bipolar cells in the rat retina. *J Comp Neurol* [Internet]. 1995;361(3):461–78. Available from: <https://doi.org/10.1002/cne.903610310>
 49. Schutte M. SEROTONERGIC AND SEROTONIN-SYNTHESIZING CELLS OF THE XENOPUS RETINA. *Int J Neurosci.* 1994;7(1992):67–73.
 50. Strettoi E, Novelli E, Mazzoni F, Barone I, Damiani D. Complexity of retinal cone bipolar cells. *Prog Retin Eye Res* [Internet]. 2010;29(4):272–83. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20362067>
 51. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia A-S, McNamara JO, et al. *Neuroscience* [Internet]. 3rd ed. Massachusetts: Sinauer Associates; 2004. 773 p. Available

- from: <https://books.google.cl/books?id=B5YXRAAACAAJ>
52. Hoon M, Okawa H, Della Santina L, Wong ROL. Functional architecture of the retina: Development and disease. *Prog Retin Eye Res* [Internet]. 2014;42(1):44–84. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S135094621400038X>
 53. Masland RH. The Neuronal Organization of the Retina. *Neuron* [Internet]. 2012;76(2):266–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2012.10.002>
 54. Thier P, Wässle H. Indoleamine-mediated reciprocal modulation of on-centre and off-centre ganglion cell activity in the retina of the cat. *J Physiol* [Internet]. 1984;351:613–30. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6747876>
 55. Mangel SC, Brunken WJ. The effects of serotonin drugs on horizontal and ganglion cells in the rabbit retina. *Vis Neurosci* [Internet]. 1992;8(3):213–8. Available from: <https://www.cambridge.org/core/article/effects-of-serotonin-drugs-on-horizontal-and-ganglion-cells-in-the-rabbit-retina/7DE05DE1D79A71BB9E643CBAC52DE920>
 56. Zhou X, Zhang R, Zhang S, Wu J, Sun X. Activation of 5-HT1A receptors promotes retinal ganglion cell function by inhibiting the cAMP-PKA pathway to modulate presynaptic GABA release in chronic glaucoma. *J Neurosci* [Internet]. 2018;1618–85. Available from: <http://www.jneurosci.org/content/early/2018/12/12/JNEUROSCI.1685-18.2018.abstract>
 57. Wässle H. Parallel processing in the mammalian retina. *Nat Rev Neurosci*. 2004;5(10):747–57.
 58. Zhang C, Kolodkin AL, Wong RO, James RE. Establishing Wiring Specificity in Visual System Circuits : From the Retina to the Brain. *Annu Rev Neurosci*. 2017;40:395–424.
 59. Vaney DI. Morphological Identification of Serotonin- Accumulating Neurons in the Living Retina. *Science*. 1986;444–6.
 60. Zhu B-S, Straznicky C, Gibbins I. Synaptic circuitry of serotonin-synthesizing and serotonin-accumulating amacrine cells in the retina of the cane toad, *Bufo marinus*. *Vis Neurosci* [Internet]. 1995;12(1):11–9. Available from: <https://www.cambridge.org/core/article/synaptic-circuitry-of-serotoninsynthesizing-and-serotoninaccumulating-amacrine-cells-in-the-retina-of-the-cane-toad-bufo-marinus/02C3636102C7B698AED2C97E610EECA9>
 61. Pourcho RG. Neurotransmitters in the retina. *Curr Eye Res* [Internet]. Taylor & Francis;

- 1996;15(7):797–803. Available from: <https://doi.org/10.3109/02713689609003465>
62. Carr DB, Cooper DC, Ulrich SL, Spruston N, Surmeier DJ. Serotonin Receptor Activation Inhibits Sodium Current and Dendritic Excitability in Prefrontal Cortex via a Protein Kinase C-Dependent Mechanism. *J Neurosci* [Internet]. 2002;22(16):6846–55. Available from: <http://www.jneurosci.org/content/22/16/6846.abstract>
 63. Jensen RJ. Effects of Antipsychotic Drugs Haloperidol and Clozapine on Visual Responses of Retinal Ganglion Cells in a Rat Model of Retinitis Pigmentosa. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2016;32(10):685–90.
 64. Coyner AS, Ryals RC, Ku CA, Fischer CM, Patel RC, Datta S, et al. Retinal Neuroprotective Effects of Flibanserine, an FDA-Approved Dual Serotonin Receptor Agonist-Antagonist. *PLoS One.* 2016;11(7):1–18.
 65. Tullis BE, Ryals RC, Coyner AS, Gale MJ, Nicholson A, Ku C, et al. Sarpogrelate, a 5-HT_{2A} Receptor Antagonist, Protects the Retina From Light-Induced Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56(8):4560–9.
 66. Biswal MR, Ahmed CM, Ildefonso CJ, Han P, Li H, Jivanji H, et al. Systemic treatment with a 5HT_{1a} agonist induces anti-oxidant protection and preserves the retina from mitochondrial oxidative stress. *Exp Eye Res* [Internet]. 2015;140:94–105. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014483515002559>
 67. Yin L, Rasch MJ, He Q, Wu S, Shu Y, Dou F. Selective Modulation of Axonal Sodium Channel Subtypes by 5-HT_{1A} Receptor in Cortical Pyramidal Neuron. *Cereb Cortex* [Internet]. 2015;27(1):509–21. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/cercor/bhv245>
 68. Protti DA, Flores-Herr N, von Gersdorff H. Light Evokes Ca²⁺ Spikes in the Axon Terminal of a Retinal Bipolar Cell. *Neuron* [Internet]. 2000;25(1):215–27. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80884-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80884-3)
 69. Cui J, Pan Z-H. Two types of cone bipolar cells express voltage-gated Na⁺ channels in the rat retina. *Vis Neurosci* [Internet]. 2008;25(5–6):635–45. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19094370>
 70. HEFLIN SJ, COOK PB. Narrow and wide field amacrine cells fire action potentials in response to depolarization and light stimulation. *Vis Neurosci* [Internet]. 2007;24(2):197–206. Available from: <https://www.cambridge.org/core/article/narrow-and-wide-field->

amacrine-cells-fire-action-potentials-in-response-to-depolarization-and-light-stimulation/94CF50A50418296CA0B55088AD628AD3

71. Watanabe S-I, Koizumi A, Yamada Y, Kaneko A. Functional Roles of Action Potentials and Na Currents in Amacrine Cells - The Neural Basis of Early Vision. In: Kaneko A, editor. Tokyo: Springer Japan; 2003. p. 55–8.
72. Randall DJ, Burggren WW, French K. Eckert Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations [Internet]. 4th ed. W.H. Freeman and Company; 1997. 727 p. Available from: <https://books.google.cl/books?id=oCMcnAEACAAJ>
73. Squire L, Berg D, Bloom FE, du Lac S, Ghosh A, Spitzer NC. Fundamental Neuroscience [Internet]. 4th ed. Elsevier Science; 2013. 1152 p. Available from: https://books.google.cl/books?id=AEmEn-_hD9IC
74. Yamamoto R, Hatano N, Sugai T, Kato N. Serotonin induces depolarization in lateral amygdala neurons by activation of TRPC-like current and inhibition of GIRK current depending on 5-HT_{2C} receptor. *Neuropharmacology* [Internet]. 2014;82:49–58. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0028390814000926>
75. Wang MY, Dun NJ. 5-Hydroxytryptamine responses in neonate rat motoneurons in vitro. *J Physiol* [Internet]. 1990;430:87–103. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2150862>
76. North RA, Uchimura N. 5-Hydroxytryptamine acts at 5-HT₂ receptors to decrease potassium conductance in rat nucleus accumbens neurones. *J Physiol* [Internet]. 1989;417:1–12. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2621587>
77. Eriksson KS, Stevens DR, Haas HL. Serotonin excites tuberomammillary neurons by activation of Na⁺/Ca²⁺-exchange. *Neuropharmacology* [Internet]. 2001;40(3):345–51. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0028390800001751>
78. Salzer I, Gantumur E, Yousuf A, Boehm S. Control of sensory neuron excitability by serotonin involves 5HT_{2C} receptors and Ca²⁺-activated chloride channels. *Neuropharmacology* [Internet]. 2016;110(Pt A):277–86. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27511837>
79. Najam A S, Senchyna M. Serotonin receptor subtype mRNA expression in human ocular tissues, determined by RT-PCR. *Mol Vis*. 2006;12:1040–7.

80. Kalbaugh TL, Zhang J, Diamond JS. Coagonist Release Modulates NMDA Receptor Subtype Contributions at Synaptic Inputs to Retinal Ganglion Cells. *J Neurosci* [Internet]. 2009;29(5):1469–79. Available from: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.4240-08.2009>
81. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* [Internet]. 2012 Jul;9(7):671–5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22930834>
82. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* [Internet]. 2012 Jun 28;9(7):676–82. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22743772>
83. Rothman JS, Silver RA. NeuroMatic: An Integrated Open-Source Software Toolkit for Acquisition, Analysis and Simulation of Electrophysiological Data [Internet]. Vol. 12, *Frontiers in Neuroinformatics*. 2018. p. 14. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fninf.2018.00014>
84. Hille B. *Ion Channel Excitable Membranes*. Sunderland Massachusetts USA. Sinauer Associates; 2001. p. 1–847.
85. Carr DB, Day M, Cantrell AR, Held J, Scheuer T, Catterall WA, et al. Transmitter modulation of slow, activity-dependent alterations in sodium channel availability endows neurons with a novel form of cellular plasticity. *Neuron*. 2003;39(5):793–806.
86. Scheuer T. Regulation of sodium channel activity by phosphorylation. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 2011;22(2):160–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2010.10.002>
87. Vaquero CF, Pignatelli a, Partida GJ, Ishida a T. A dopamine- and protein kinase A-dependent mechanism for network adaptation in retinal ganglion cells. *J Neurosci* [Internet]. 2001;21(21):8624–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11606650>
88. Hayashida Y, Rodriguez C V., Ogata G, Partida GJ, Oi H, Stradleigh TW, et al. Inhibition of Adult Rat Retinal Ganglion Cells by D1-Type Dopamine Receptor Activation. *J Neurosci* [Internet]. 2009;29(47):15001–16. Available from: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.3827-09.2009>
89. Talley EM, Lei Q, Sirois JE, Bayliss DA. TASK-1, a two-pore domain K⁺channel, is

- modulated by multiple neurotransmitters in motoneurons. *Neuron*. 2000;25(2):399–410.
90. Chapin EM, Andrade R. A 5-HT₇ Receptor-Mediated Depolarization in the Anterodorsal Thalamus. II. Involvement of the Hyperpolarization-Activated Current I_h. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 2001;297(1):403–409. Available from: <http://jpet.aspetjournals.org/content/297/1/403.abstract>
 91. Witkovsky P. Dopamine and retinal function. *Doc Ophthalmol* [Internet]. 2004;108(1):17–39. Available from: <https://doi.org/10.1023/B:DOOP.0000019487.88486.0a>
 92. Weilinger NL, Maslieieva V, Bialecki J, Sridharan SS, Tang PL, Thompson RJ. Ionotropic receptors and ion channels in ischemic neuronal death and dysfunction. *Acta Pharmacol Sin* [Internet]. 2013;34(1):39–48. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22864302>