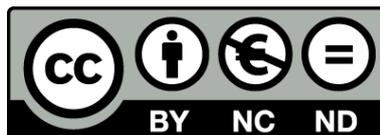




UNIVERSITAT<sup>DE</sup>  
BARCELONA

## **Papel de la corteza infralímbica en el trastorno depresivo mayor: relevancia para nuevas estrategias antidepresivas**

Elena López Terrones



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**



**Papel de la corteza infralímbica  
en el trastorno depresivo mayor:  
relevancia para nuevas estrategias  
antidepresivas**

Elena López Terrones  
Tesis doctoral | Enero 2023





Programa de doctorado en Biomedicina

# **Papel de la corteza infralímbica en el trastorno depresivo mayor: relevancia para nuevas estrategias antidepresivas**

Tesis doctoral

Director

**Francesc Artigas Pérez**

Codirector

**Maurizio Riga**

Tutor

**Josep Saura Martí**

Doctoranda

**Elena López Terrones**

Departament de Neurociències i Terapèutica Experimental, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, IIBB-CSIC; Barcelona, Spain

Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain



La presente tesis doctoral ha sido realizada gracias a la siguiente beca predoctoral:

**Ayudas para contratos predoctorales para la formación de doctores (FPI)** del Ministerio de Economía y Competitividad. Código: BES-2016-078718

Y financiada mediante los proyectos siguientes:

**Alteraciones de la corteza infralímbica en depresión: mecanismo de acción de nuevas estrategias antidepressivas.** Referencia: SAF2015-68346. Financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad y cofinanciado con fondos FEDER.

**Modulación de circuitos cortico-mesencefálicos y cortico-límbicos por nuevas terapias antidepressivas.** Referencia: PI16/00287. Financiado por el Instituto de Salud Carlos III y cofinanciado con fondos FEDER.

**Grup d'Investigació consolidat, Neuroquímica i Neurofarmacologia.** Referencia: 2017SGR717. Financiado por la Generalitat de Catalunya.



# Índice

---

ABREVIATURAS.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
TRASTORNO DEPRESIVO MAYOR .....	4
Características sintomatológicas.....	4
Epidemiología e impacto socioeconómico.....	4
Etiología y fisiopatología .....	7
Hipótesis monoaminérgica .....	9
Eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) y respuesta al estrés .....	9
Hipótesis neurotrófica .....	11
Inflamación .....	11
Alteraciones neuroanatómicas y funcionales. Enfoque en la corteza cingulada anterior ventral (vACC) .....	12
Tratamientos antidepresivos .....	14
Inhibidores de la monoaminoxidasa (IMAO) .....	14
Antidepresivos tricíclicos (ATC).....	15
Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina y de serotonina y noradrenalina (ISRS y IRSN) .....	16
Mecanismos implicados en el retraso de la acción terapéutica de los antidepresivos clásicos .....	17
Nuevas estrategias antidepresivas de acción rápida .....	19
CORTEZA PREFRONTAL.....	20
Localización y función .....	20
División funcional de la corteza prefrontal .....	21

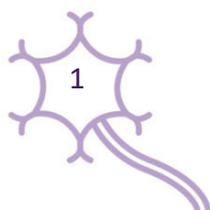
Citoarquitectura de la corteza prefrontal .....	24
Neurotransmisión en la corteza prefrontal.....	27
Conectividad de la corteza prefrontal.....	33
EL NÚCLEO DEL RAFE DORSAL.....	36
Localización.....	36
Composición neuronal y conectividad del núcleo del rafe dorsal.....	37
Neuronas serotoninérgicas del núcleo del rafe dorsal .....	39
Neuronas GABAérgicas del núcleo del rafe dorsal.....	43
Neurotransmisión en el núcleo del rafe dorsal.....	44
CONECTIVIDAD ENTRE LA CPFm Y EL NRD .....	46
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>51</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>55</b>
TRABAJO 1 .....	57
TRABAJO 2 .....	75
TRABAJO 3 .....	117
INFORME DEL DIRECTOR (TESIS POR ARTÍCULOS) .....	133
RESUMEN DE RESULTADOS .....	135
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>139</b>
CONTROL DE LA ACTIVIDAD DE LA CPFm (SUBDIVISIONES PrL E IL) POR LA SEROTONINA ENDÓGENA (TRABAJO 1).....	141
Diferente sensibilidad de IL y PrL a la estimulación del núcleo del rafe dorsal.....	142
Mecanismos implicados.....	142
Relevancia para el tratamiento antidepresivo .....	147
CONTROL DE LA ACTIVIDAD SEROTONINÉRGICA DEL NRD POR LA ESTIMULACIÓN DE LAS ÁREAS PrL E IL DE LA CPFm (TRABAJO 2).....	149
Modulación de la actividad de las neuronas 5-HT del NRD por la estimulación eléctrica de IL y PrL a distintas frecuencias.....	150

Receptores involucrados en la modulación de la actividad 5-HT por la estimulación de IL y PrL a 20 Hz .....	152
Modulación diferencial de la liberación de 5-HT en el NRD por la estimulación de IL y PrL .....	153
DIFERENTE EXPRESIÓN DEL 5-HT <sub>2B</sub> -R EN EL NRD DE RATA Y RATÓN (TRABAJO 3) .....	156
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>159</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>163</b>

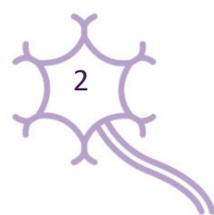


# Abreviaturas

<b>5-HT</b>	Serotonina (5-hidroxitriptamina)
<b>5-HT-R</b>	Receptor de serotonina
<b>AC</b>	Área cingulada anterior
<b>ACTH</b>	Hormona adrenocorticotrópica
<b>AGm</b>	Área agranular medial
<b>AHP</b>	Período post-hiperpolarización
<b>AP</b>	Potencial de acción
<b>ATC</b>	Antidepresivos tricíclicos
<b>ATV</b>	Área tegmental ventral
<b>BDNF</b>	Factor neurotrófico derivado del cerebro
<b>CCAv</b>	Corteza cingulada anterior ventral
<b>Cg25</b>	Área 25 de Brodmann de la corteza cingulada
<b>COF</b>	Corteza orbitofrontal
<b>CPF</b>	Corteza prefrontal
<b>CPFdl</b>	Corteza prefrontal dorsolateral
<b>CPFdm</b>	Corteza prefrontal dorsomedial
<b>CPFll</b>	Corteza prefrontal lateral
<b>CPFm</b>	Corteza prefrontal medial
<b>CPFvl</b>	Corteza prefrontal ventrolateral
<b>CPFvm</b>	Corteza prefrontal ventromedial
<b>CRF</b>	Factor de liberación de corticotropina
<b>CRH</b>	Hormona liberadora de corticotropina
<b>DA</b>	Dopamina
<b>DAT</b>	Transportador de dopamina
<b>DBS</b>	Estimulación cerebral profunda
<b>ENK</b>	Enkefalina
<b>DSM-5</b>	Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales
<b>GABA</b>	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>GABA-R</b>	Receptor GABA
<b>HPA</b>	Eje hipotalámico-pituitario-adrenal
<b>IL</b>	Corteza infralímbica
<b>IMAO</b>	Inhibidores de la monoamino oxidasa
<b>IRSN</b>	Inhibidores duales de la recaptación de serotonina y noradrenalina
<b>ISRS</b>	Inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina
<b>KET</b>	Ketamina
<b>LC</b>	Locus coeruleus
<b>MAO</b>	Monoamino oxidasa
<b>mGluR</b>	Receptor metabotrópico de glutamato
<b>MOs</b>	Corteza motora secundaria
<b>NA</b>	Noradrenalina
<b>NAT</b>	Transportador de noradrenalina



<b>NK1</b>	Receptor neurokinina 1
<b>NPY</b>	Neuropéptido Y
<b>NR</b>	Núcleos del rafe
<b>NRD</b>	Núcleo del rafe dorsal
<b>NRDd</b>	Zona dorsal del núcleo del rafe dorsal
<b>NRDdl</b>	Zona dorsolateral del núcleo del rafe dorsal
<b>NRDv</b>	Zona ventral del núcleo del rafe dorsal
<b>NRDvl</b>	Zona ventrolateral del núcleo del rafe dorsal
<b>OMS</b>	Organización mundial de la salud
<b>PIC</b>	Picrotoxinina
<b>PrL</b>	Corteza prelímbica
<b>SERT</b>	Transportador de serotonina
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>STAR*D</b>	Estudio de alternativas de tratamiento secuenciales para la depresión
<b>TDM</b>	Trastorno depresivo mayor



# Introducción

# TRASTORNO DEPRESIVO MAYOR

## Características sintomatológicas

---

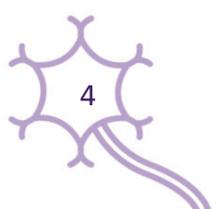
El trastorno depresivo mayor (TDM) se caracteriza sobre todo por sentimientos profundos de **desesperanza**, tristeza, o vacío y también por **anhedonia**, pérdida de interés y/o incapacidad de sentir placer por aquello que antes era agradable para el individuo afectado. Además de estos síntomas principales, se incluyen otros como: **alteraciones en el sueño**, **fatiga**, cambios en el **apetito** y en el **peso** (por exceso o por defecto), **ansiedad**, dificultad para **concentrarse**, **enlentecimiento** (corporal y/o del habla) o **agitación**, sentimientos excesivos e inapropiados de **culpa e inutilidad**, atribución interna y estable de los fracasos y externa e inestable de los éxitos, pensamientos recurrentes sobre la muerte que pueden ir acompañados de **intentos suicidas** o, en el peor de los casos, suicidio consumado. Para el diagnóstico del TDM, estos síntomas deben estar presentes casi todos los días durante al menos dos semanas (American Psychiatric Association, 2013).

El diagnóstico de este trastorno implica que la persona presenta un importante deterioro en el funcionamiento y malestar significativo. Con frecuencia el TDM presenta comorbilidad con otros trastornos (sobre todo con trastornos de ansiedad) complicando así la sintomatología y el tratamiento.

## Epidemiología e impacto socioeconómico

---

Los trastornos del estado de ánimo, entre los que el TDM es el más prevalente, suponen un gasto de **113.000 millones** de euros a nivel europeo, el **mayor coste socioeconómico** derivado de una patología psiquiátrica (Gustavsson et al., 2011). El TDM es altamente **incapacitante**, generando un alto nivel de sufrimiento y un gran deterioro funcional en todos los aspectos de la vida diaria (laboral, social, escolar, familiar...) y se considera una de las principales causas de



incapacidad producida por enfermedad a nivel mundial, siendo la **primera causa de años vividos con discapacidad** en 56 países, la segunda en otros 56 y la tercera en 34 países (Vos et al., 2015).

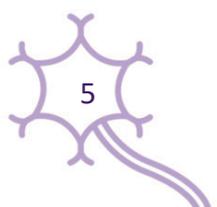
En España, el **82,5% de los gastos** producidos por los trastornos depresivos son debido a los **costes indirectos** de la patología. Así, entre ellos, el 60,5 % son debidos a incapacidad laboral permanente y un 17,1% a la incapacidad laboral temporal (Vieta et al., 2021). Este gran impacto económico es reflejo principalmente de los siguientes factores:

**Una alta prevalencia:** El TDM presenta una **prevalencia anual de un 7%** según el manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (DSM-5), siendo más común en mujeres que en hombres en una proporción 2:1 (American Psychiatric Association, 2013). Si hablamos de **prevalencia vital total**, en España es de un **10.6%** (en mujeres en torno al 15%), siendo esta prevalencia la mayor entre los principales trastornos mentales (Haro et al., 2006).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) más de **300 millones** de personas en todo el mundo padecen depresión y, durante la reciente pandemia COVID-19, la incidencia del TDM **aumentó un 25%** en el primer año. Múltiples estudios muestran aumentos significativos en sintomatología depresiva en la población tanto en España (González-Sanguino et al., 2020; Muñoz-Navarro et al., 2021), como en otros países (Gao et al., 2020; Sani et al., 2020; Wang et al., 2020).

**Aparición del TDM en etapas productivas de la vida adulta, larga duración de los episodios y alta recurrencia:** La edad media de aparición del trastorno son los **30 años** y en un 75% de los casos aparece antes de los 44 años (Solmi et al., 2022). La duración media de un episodio depresivo puede encontrarse sobre los 6 y 8 meses (Kovacs et al., 2016; Melartin et al., 2004; Spijker et al., 2002) y los pacientes depresivos tienen una media entre 4 y 5 episodios a lo largo de su vida (Moreno et al., 2012). El **porcentaje de recaída** a lo largo de la vida se encuentra alrededor del 75% (Kovacs et al., 2016; Perlis et al., 2006; Verduijn et al., 2017) y tiene una **cronicidad** media de entre un 10 y un 15% (Malhi et al., 2018; Vázquez & Sanz, 2020).

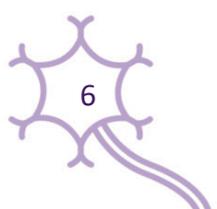
**Baja eficacia del tratamiento farmacológico y gran período de latencia de respuesta:** La evidencia nos muestra una **tasa de respuesta de entre un 40% y un 60%** y **tasas de remisión de entre un 30% y un 45%** utilizando los fármacos antidepresivos habituales que inhiben la recaptación neuronal de monoaminas, en particular serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) y/o noradrenalina (NA) (Carvalho et al., 2007; Gartlehner et al., 2011; Goldstein et al., 2002;



Nierenberg et al., 2007; Stahl, 2000; Thase et al., 2001; Tollefson & Holman, 1994; Trivedi, Fava, et al., 2006; Trivedi, Rush, et al., 2006). Si bien es cierto que la tasa de remisión puede incrementarse hasta un 67% tras el uso de cuatro secuencias de tratamiento con diferentes fármacos antidepresivos a lo largo de un año, según muestra el estudio STAR\*D (Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression) (Rush et al., 2006). En definitiva, en el mejor de los casos, alrededor de **un tercio de los pacientes con TDM no responden de manera adecuada** a los actuales tratamientos farmacológicos antidepresivos. Además, aquellos que mejoran con el tratamiento, deben esperar unas **3 o 4 semanas** hasta obtener una respuesta significativa (Trivedi, Fava, et al., 2006). Todos estos datos indican la existencia **un alto porcentaje de resistencia al tratamiento** en esta patología, cronificando el sufrimiento y la incapacidad de la persona y, por consiguiente, aumentando el gasto socioeconómico.

Dejando a un lado las causas principales que influyen en los costes del TDM, hay que sumarle otros factores de riesgo a los que se asocia el trastorno. Por un lado, las personas que sufren de depresión, independientemente de la edad que tengan, tienen mayor probabilidad que la población general de sufrir ciertas **enfermedades físicas**, como diabetes, enfermedades cardiovasculares, dolor, Alzheimer, accidentes cerebrovasculares, osteoporosis, etc. (Bair et al., 2003; Caraci et al., 2010; Kashfi et al., 2022; Medeiros et al., 2020; Semenkovich et al., 2015; Zhang et al., 2018)

Por otra parte, el TDM es un factor de riesgo muy importante para la **conducta suicida**, siendo esta la causa de muerte de 800.000 personas anualmente según datos de la OMS y la segunda causa de muerte en jóvenes de entre 15 y 29 años. Las personas con depresión tienen un riesgo **21 veces mayor** que la población general de morir por suicidio (SEP, 2015). Se ha observado un **aumento del riesgo de conducta suicida durante el primer mes de tratamiento antidepresivo**, especialmente en los primeros 9 días (Jick et al., 2004; Simon et al., 2006), lo que puede estar directamente relacionado con un aumento de energía física en presencia de los pensamientos negativos y el estado de ánimo depresivo debido a la alta latencia de respuesta de los antidepresivos (Machado-Vieira et al., 2010). Por otro lado, las dosis clínicas habituales de los inhibidores de la recaptación de 5-HT (ISRS) inducen una reducción paradójica de su liberación terminal, fenómeno debido a un mecanismo de autoinhibición dependiente de los autoreceptores 5-HT<sub>1A</sub> (Artigas et al., 2018; Nord et al., 2013). Dado el papel clave de la 5-HT en el control del estado de ánimo, dicha reducción funcional de 5-HT puede agravar el cuadro clínico



al inicio del tratamiento, aumentando el riesgo suicida hasta que dichos receptores no se desensibilizan o se bloquean mediante estrategias farmacológicas (Artigas et al., 1996, 2001). La importancia del autoreceptor 5-HT<sub>1A</sub> en TDM es tal que su bloqueo farmacológico permite acelerar y aumentar la respuesta antidepresiva (Pérez et al., 1997; Portella et al., 2011), aunque no existen estudios que evalúen si dicho bloqueo farmacológico permite reducir las tasas de suicidio en pacientes con TDM.

Así pues, la reducción del riesgo suicida es otra de las razones por las que urge encontrar nuevas estrategias antidepresivas cuya acción sea más rápida que la de los fármacos monoaminérgicos.

## Etiología y fisiopatología

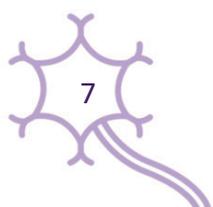
---

A pesar de los grandes avances conseguidos en las últimas décadas por la investigación en Neuropsicofarmacología, la etiología y fisiopatología de la depresión siguen siendo mal conocidas y no permiten definir una causa clara para el trastorno. Todo nos lleva a pensar que la etiología del TDM se basa en una combinación de **factores genéticos, ambientales y epigenéticos**.

Se asume que el riesgo de padecer la enfermedad estaría influenciado entre un **30% y 40% por factores genéticos**, mientras que entre el **60% y 70%** restante pertenecería a **factores ambientales** (Saveanu & Nemeroff, 2012). Diversos estudios han relacionado un polimorfismo en el gen del transportador de 5-HT

**SLC6A4** con el TDM. Este polimorfismo (**5HTTLPR**) presenta dos variaciones alélicas una larga (L) y una **corta (S)**, siendo esta última un factor de riesgo para el TDM (Haenisch et al., 2013; Karg et al., 2011).

Por otra parte, sujetos con una alta expresión del autoreceptor 5-HT<sub>1A</sub>, incluyendo aquellos con un polimorfismo funcional en la región promotora del gen *Htr1a* presentan una mayor susceptibilidad a depresión y suicidio, así como una menor respuesta a fármacos antidepresivos (Fakra et al., 2009; Lemonde et al., 2003; Neff et al., 2009; Stockmeier et al., 1998; Sullivan et al., 2009). La implicación de ambos genes es totalmente consistente con el papel clave jugado por el transportador de 5-HT (SERT) y el autoreceptor 5-HT<sub>1A</sub> en el control de la actividad 5-HT, situados a un nivel funcional previo (*upstream*) a otros mecanismos implicados en TDM y en respuesta antidepresiva (Artigas, 2013).



Sin embargo, se ha observado que el TDM está influenciado por muchas variantes de riesgo (Ripke et al., 2013; Wray et al., 2012), siendo más común que las personas afectadas sean portadoras de múltiples variaciones alélicas de riesgo y no de una sola variación característica (Colodro-Conde et al., 2018).

Desde el modelo explicativo biopsicosocial de **diátesis-estrés** (o vulnerabilidad-estrés) se asume que cada persona tiene una **vulnerabilidad psicobiológica** (factores genéticos de riesgo o protección, predisposiciones temperamentales, género, etc) que va a interactuar con **eventos vitales estresantes**. La probabilidad de desarrollar un TDM ante estos estresores, va a depender de esa sensibilidad al estrés (vulnerabilidad) idiosincrásica de la persona (Schotte et al., 2006). Varias investigaciones que combinan el estudio de factores genéticos implicados en el TDM y estresores determinantes ambientales respaldan este modelo (Clarke et al., 2019; Colodro-Conde et al., 2018; Kendler et al., 2001).

A nivel neurobiológico, la gran heterogeneidad dentro del mismo diagnóstico y la combinación de síntomas de distinta naturaleza (cognitivos, emocionales, motores y neurovegetativos) sugieren que múltiples variables confluyen para inducir un fenotipo depresivo. De hecho, cada vez es más común posicionarse hacia una **visión integradora** que, más allá de rechazar ciertas teorías, enfatiza la interacción entre todas ellas (**Figura 1**).

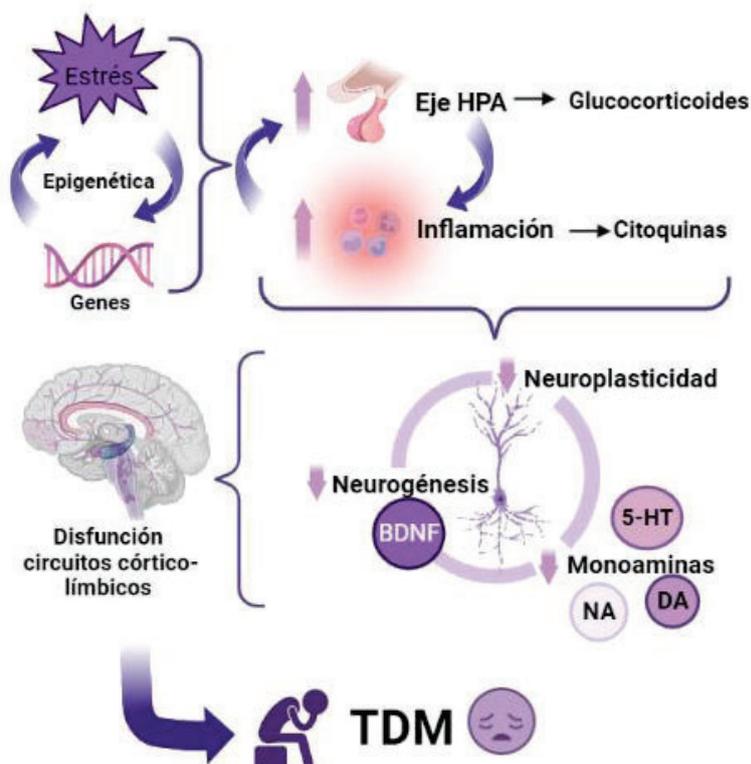


Figura 1. Esquema de la fisiopatología y etiología del trastorno depresivo mayor (TDM) desde un punto de vista integrador de las diversas teorías

A continuación, se resumen brevemente los modelos neurobiológicos más estudiados con respecto al TDM:

## Hipótesis monoaminérgica

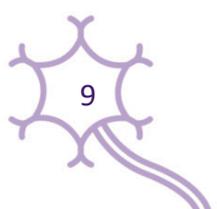
En los años 60 del siglo XX surge la primera propuesta para explicar la neurobiología de la depresión, la hipótesis monoaminérgica, la cual propone que una **baja disponibilidad de las monoaminas** a nivel cerebral, especialmente **5-HT y NA**, es responsable de los síntomas depresivos. Esta conclusión fue inferida al notar que el fármaco antihipertensivo reserpina provocaba sintomatología depresiva en los pacientes hipertensos. La reserpina interfiere en el almacenaje vesicular de 5-HT y NA, deplecionando los niveles de monoaminas presinápticos disponibles para su liberación en la sinapsis (Hirschfeld, 2000).

Por otro lado, se observó que los primeros fármacos antidepresivos, descubiertos por serendipia en la década de los 1950s, inhibían los mecanismos de recaptación neuronal de 5-HT y/o NA (fármacos tricíclicos del tipo imipramina) o bien su degradación metabólica a través de la monoamino oxidasa (MAO) (inhibidores de la MOA, IMAOS), lo que reforzó la asociación entre sintomatología depresiva y baja disponibilidad de monoaminas.

Si bien esta hipótesis ha servido para el desarrollo de fármacos antidepresivos y ha sido aceptada durante muchos años, **no hay evidencia** que corrobore una relación causal entre los bajos niveles de monoaminas y el TDM dado que la función 5-HT también se ha visto alterada en otros trastornos y en personas que no padecen depresión (Moncrieff et al., 2022). A pesar de que esta teoría podría estar en línea con la acción de los fármacos antidepresivos más usados (ISRS e inhibidores duales de la recaptación de 5-HT y noradrenalina (IRSN); Ver apartado: 1.4.3), deja sin explicar la latencia en la respuesta de los antidepresivos, puesto que, a pesar del aumento de monoaminas que provocan en un corto período de tiempo, los efectos no aparecen hasta al menos 2-3 semanas después del inicio del tratamiento (Stahl, 2000).

## Eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) y respuesta al estrés

Los **eventos vitales estresantes** son factores precipitantes para el desarrollo del TDM (Caspi et al., 2003) y no sólo influyen los sucesos estresantes próximos en el tiempo, sino que una gran proporción de personas que desarrollan la patología en la edad adulta, han sufrido situaciones de

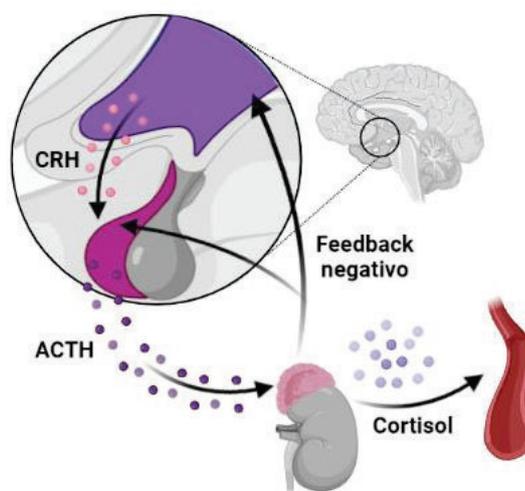


**estrés continuadas durante la infancia**, como negligencia, abusos, violencia familiar, etc (McLaughlin et al., 2010)

El **eje HPA** es un circuito hormonal crucial del sistema neuroendocrino que está estrechamente relacionado con la respuesta al estrés. Tiene tres componentes principales (**Figura 2**):

- **Hipotálamo**: Ante un evento estresante, produce vasopresina y la hormona liberadora de corticotropina (CRH)
- **Hipófisis anterior o glándula pituitaria anterior**: la presencia de vasopresina y CRH estimula en la hipófisis la liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH)
- **Corteza suprarrenal**: genera cortisol cuando es estimulada por la ACTH.

Este sistema se autorregula mediante feedback negativo ya que el mismo cortisol frena la producción de CRH y ACTH en el hipotálamo y la hipófisis respectivamente.



**Figura 2. Funcionamiento del eje hipotalámico-pituitario-adrenal.** El hipotálamo libera la hormona liberadora de corticotropina (CRH), lo que estimula la liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) por la hipófisis anterior y por último la corteza suprarrenal genera el cortisol que se libera en el torrente sanguíneo y autorregula el sistema mediante feedback negativo.

En personas que sufren TDM se ha observado un **eje HPA hipersensible** con una activación excesiva que además presenta déficits en la autorregulación a través del feedback negativo (Arana et al., 1985; Pruessner et al., 2003).

Sin embargo, la disfunción del eje HPA, no es una característica particular ni definitoria del TDM, puesto que está presente también en otras patologías psiquiátricas como en la esquizofrenia, el trastorno de estrés postraumático, el trastorno bipolar o trastornos de ansiedad (Belvederi Murri et al., 2016; Cherian et al., 2019; Dunlop & Wong, 2019; Frankiensztajn et al., 2020).

## Hipótesis neurotrófica

Desde esta perspectiva se postula que **bajas concentraciones de factores neurotróficos**, en concreto el factor neurotrófico derivado del cerebro (*brain derived neurotrophic factor* o BDNF), provocan variaciones tanto morfológicas como funcionales en diversas áreas cerebrales, que serían responsables, en todo o en parte, de la sintomatología depresiva.

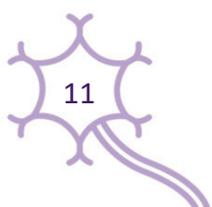
Los factores neurotróficos se encargan de regular la neurogénesis y neuroplasticidad. El BDNF promueve la diferenciación y el crecimiento de nuevas neuronas y sinapsis, además de ser clave para la supervivencia de las neuronas existentes (Hashimoto et al., 2004).

En necropsias procedentes de pacientes con TDM y de conductas suicidas se han observado **bajos niveles de BDNF** (Lee & Kim, 2009; Monteleone et al., 2008), sobre todo en el hipocampo (Karege et al., 2005). Por el contrario, el tratamiento crónico con fármacos de acción 5-HT, como los ISRS, aumenta la expresión de BDNF en el hipocampo de roedores (Nibuya et al., 1996) y en el plasma de pacientes con TDM (Piccinni et al., 2008). Finalmente, se ha sugerido que el BDNF sea probablemente necesario para la adaptación de los circuitos límbicos y corticales a los cambios ambientales (Dean & Keshavan, 2017).

## Inflamación

Varios estudios muestran una **relación bidireccional entre el TDM y los procesos inflamatorios** (Beurel et al., 2020; Kiecolt-Glaser et al., 2015). Así, existe una alta comorbilidad entre enfermedades inflamatorias y depresión (Nerurkar et al., 2019; Nicholas y Gooderham, 2017; Yuan et al., 2021).

Además, se ha relacionado el TDM con un **aumento en marcadores inflamatorios** como las citoquinas IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$  (O'Brien et al., 2004). También se ha observado que los antidepresivos son capaces de reducir la respuesta inflamatoria aumentando los niveles de citoquinas antiinflamatorias como la IL-10 (O'Brien et al., 2004; Tousoulis et al., 2009), de la



misma manera que la inhibición de vías inflamatorias puede dar lugar a una mejora de la sintomatología depresiva (Guo et al., 2019; Song et al., 2021).

## Alteraciones neuroanatómicas y funcionales. Enfoque en la corteza cingulada anterior ventral (vACC)

Gracias a las diversas técnicas de neuroimagen con las que contamos hoy en día, se han podido estudiar las alteraciones presentes en pacientes con TDM tanto a nivel morfológico como funcional en múltiples áreas del cerebro.

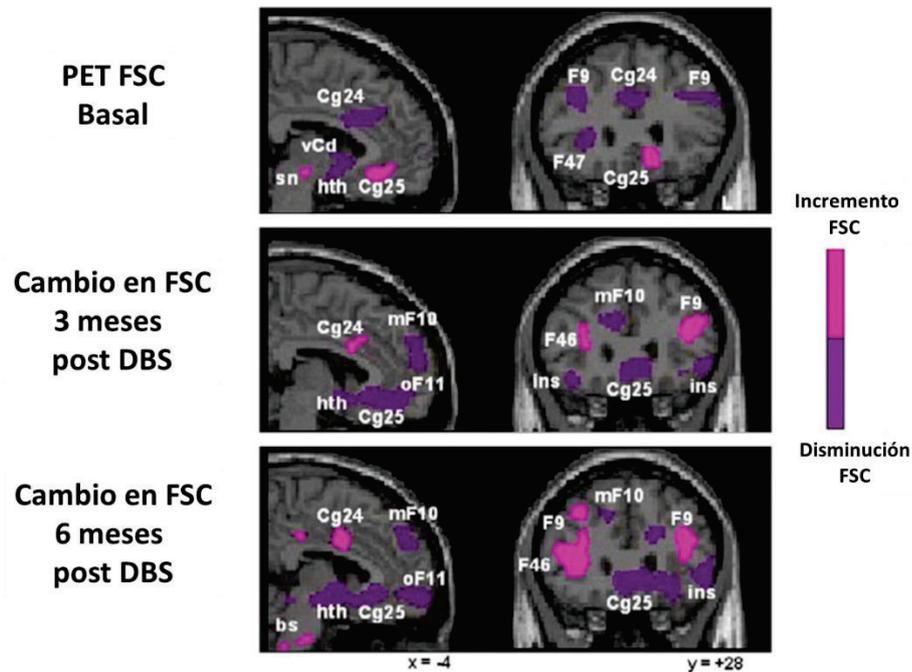
De todos los estudios se puede concluir que el cerebro de los pacientes con TDM presenta una reducción de volumen en diversas áreas cerebrales tanto corticales como subcorticales. En particular, el **hipocampo** ha sido una de las estructuras más estudiadas en el TDM, presentando una **atrofia y reducción de volumen** en pacientes depresivos que correlacionaba con la gravedad de los síntomas y el grado de recurrencia (MacQueen et al., 2003; McKinnon et al., 2009; Schmaal et al., 2016).

Por otra parte, también se ha reportado una **disminución de volumen** en diversas áreas subcorticales como el **globo pálido, caudado, putamen, tálamo, núcleo accumbens, ínsula y amígdala** (Ancelin et al., 2019; Bora et al., 2012; van Cauwenberge et al., 2021), aunque en este último caso también hay evidencias que defienden un tamaño amigdalino aumentado (Frodl et al., 2003; Saleh et al., 2012).

Con respecto a las áreas corticales, se ha observado una **disminución de volumen** en diversas regiones de la **corteza prefrontal (CPF), como la orbital, dorsolateral, ventrolateral y dorsomedial** (COF, CPFdl, CPFvl y CPFdm, respectivamente)(Bora et al., 2012; Bremner et al., 2002; Lai et al., 2000)

También se ha observado un **menor tamaño de la corteza cingulada anterior ventral (CCAv,** o corteza prefrontal ventromedial, CPFvm, que incluye el área 25 de Brodmann, Cg25, debajo del genu del cuerpo calloso) en pacientes con TDM (Botteron et al., 2002; Drevets et al., 1997) En relación con esto, diversos estudios tanto estructurales como funcionales, destacan **la importancia de la CCAv en el TDM** mostrando una **hiperactividad** en pacientes con TDM (Drevets et al., 2008; Mayberg et al., 2005). Además, las nuevas estrategias de tratamiento que generan una **mejoría inmediata**, como la administración de ketamina (KET) y la estimulación cerebral profunda (DBS), revierten tal hiperactivación en la CCAv (**Figura 3**), correlacionando una

disminución en el metabolismo de esta área con una mejoría en la sintomatología depresiva (Mayberg et al., 2005; Morris et al., 2020).



**Figura 3.** Cambios en el flujo sanguíneo cerebral (FSC) mediante tomografía por emisión de positrones (PET) tras la estimulación cerebral profunda (DBS) en pacientes resistentes a tratamiento convencional para la depresión mayor. FSC basal respecto a sujetos control (fila 1), después de 3 meses (fila 2) y de 6 meses (fila 3) tras DBS. Modificado de Mayberg et al., (2005).

A su vez se ha observado una **hipofunción de la CPFdl** en personas con TDM (Biver et al., 1994; Galynker et al., 1998; Kimbrell et al., 2002; Rigucci et al., 2009) que revierte tras el tratamiento antidepresivo (Mayberg et al., 2000).

La importancia de estas alteraciones en áreas ventrales de la CPF trasciende de largo los meros efectos locales, dada su conectividad con numerosas áreas corticales y subcorticales y el control jerárquico (*top-down*) de la actividad neuronal que ejerce en ellas (ver apartado 2.5).

# Tratamientos antidepresivos

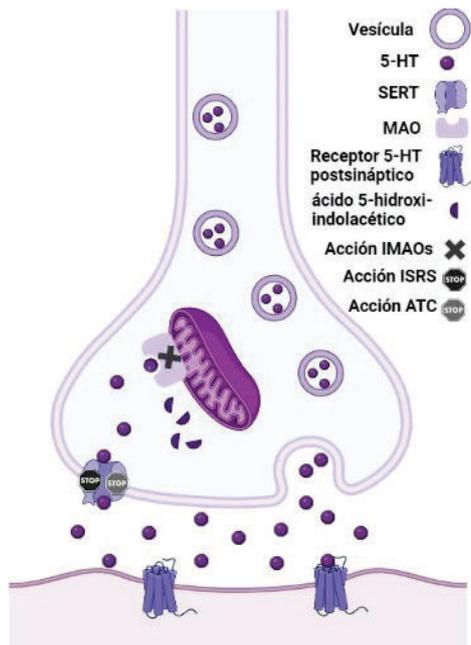
---

## Inhibidores de la monoaminoxidasa (IMAO)

Los primeros fármacos antidepresivos en desarrollarse fueron los IMAO en los años 50. Se encargan de **bloquear la encima MAO**, cuyo papel es degradar varios tipos de neurotransmisores (NA, 5-HT, dopamina (DA) y tiramina) y por tanto la acción de estos fármacos **incrementa los niveles de estas monoaminas** en el cerebro (Baker et al., 1992), sobre todo las fracciones activas (extracelulares), responsables de activar los receptores de membrana (Celada & Artigas, 1993) (**Figura 4**).

Sin embargo, no son fármacos de primera elección debido a sus **múltiples efectos secundarios** como sequedad de boca, somnolencia, hipotensión, náuseas, mareos, aumento de apetito y peso, disminución del deseo sexual, etc (Wimbiscus et al., 2010). Además, la MAO-A se encarga de metabolizar la tiramina consumida en la dieta. Por ello, los IMAO inducen cuadros hipertensivos -en ocasiones letales- en pacientes que han consumido alimentos ricos en tiramina como quesos, carnes y pescados curados o ahumados, bebidas alcohólicas, embutidos e incluso algunos tipos de vegetales. Este efecto (*cheese effect*) es debido a la capacidad de la tiramina de liberar catecolaminas (NA, DA) de sus depósitos periféricos (e.g., glándulas suprarrenales), produciendo de este modo un aumento incontrolado de la presión arterial (Wimbiscus et al., 2010). Por otro lado, tampoco pueden combinarse con otros fármacos como los ISRS, IRSN o los antidepresivos tricíclicos (ATC), ya que esto puede resultar en un **síndrome serotoninérgico** (afección letal en ciertos casos), debido a un exceso de la actividad 5-HT en el sistema nervioso central (SNC) (Culpepper, 2012).

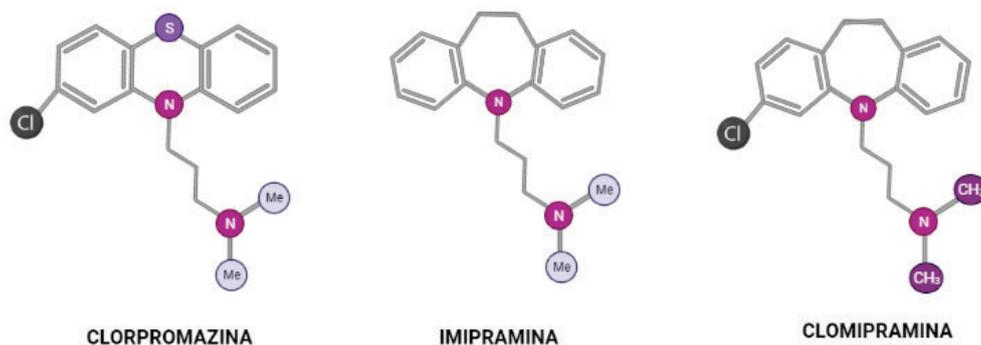
Por todo ello, y a pesar de su excelente eficacia terapéutica en TDM, los IMAO han caído en desuso debido a sus importantes efectos secundarios.



**Figura 4. Acción de los fármacos antidepresivos.** Los axones de neuronas serotonérgicas almacenan serotonina (5-HT) en vesículas sinápticas, que se libera al espacio sináptico tras la llegada de impulsos nerviosos. Una vez allí la 5-HT puede activar receptores 5-HT de la neurona postsináptica o ser recaptada por el transportador de 5-HT (SERT) volviendo de nuevo al terminal 5-HT. La enzima monoaminoxidasa (MAO) actúa degradando la 5-HT en la membrana mitocondrial dentro de la neurona 5-HT. Tanto los inhibidores selectivos o duales de la recaptación de serotonina (ISRS e ISRN) como los antidepresivos tricíclicos (ATC) actúan bloqueando los SERT, mientras que los inhibidores de la MAO (IMAO) actúan impidiendo la degradación de 5-HT por la MAO.

### Antidepresivos tricíclicos (ATC)

Los ATC fueron los segundos fármacos antidepresivos en ser descubiertos, de manera fortuita (serendipia), tras los IMAO, cuando se estaban buscando análogos de clorpromacina, el primer fármaco antipsicótico, para ser desarrollados también como nuevos antipsicóticos (**Figura 5**).



**Figura 5. Formulas químicas de clorpromazina (primer fármaco antipsicótico), imipramina (primer fármaco antidepresivo) y clomipramina (análogo clorado de imipramina, uno de los fármacos antidepresivos más eficaces).** La sustitución de un átomo de azufre (S) por un puente etilo (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) en el anillo tricíclico induce un cambio radical de las características farmacológicas y terapéuticas, transformando un antagonista de receptores DA D2 con acción antipsicótica (clorpromazina) en inhibidores de recaptación de las monoaminas (con acción antidepresiva imipramina y clomipramina)

Su acción **inhibe la recaptación de 5-HT y NA** y, por tanto, aumenta los niveles extracelulares (fracción activa) de estas monoaminas en el encéfalo (**Figura 4**). Sin embargo, también **bloquean receptores muscarínicos, histamínicos y adrenérgicos**, dando lugar a efectos adversos característicos como: sequedad de boca, taquicardia, sedación, confusión, aumento de peso, disfunción eréctil o síntomas extrapiramidales entre otros (Bet et al., 2013) Por ello su uso se ha visto superado por fármacos antidepresivos con el mismo mecanismo de acción terapéutica (inhibición de la recaptación de 5-HT y/ 5-HT/NA) (ver sección 1.4) aunque alguno de ellos, como clomipramina han mostrado mayor eficacia que los ISRS en estudios controlados (Danish University Antidepressant Group, 1986, 1990) y se usa también en el trastorno obsesivo compulsivo.

### Inhibidores selectivos de la recaptación de 5-HT y noradrenalina (ISRS y IRSN)

En los años 80 se desarrollaron los ISRS y IRSN, los cuales son actualmente fármacos de **primera elección** para tratar la depresión grave y moderada ya que, aunque no se consideran más efectivos que los ATC con respecto a la mejora de sintomatología depresiva, sí que producen

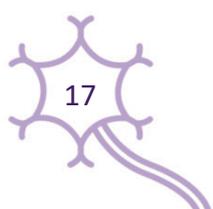
menos efectos secundarios en general y tienen una **mayor tolerabilidad** (Anderson, 2000). Además, y a diferencia de los ATC y los IMAOs, por los menores efectos secundarios de ISRS e IRSN, las pautas terapéuticas pueden administrarse desde el inicio de tratamiento. Estos fármacos presentan una **fuerte inhibición selectiva de la recaptación de 5-HT** (en el caso de los ISRS) (**Figura 4**) y **de la 5-HT y NA** (en el caso de los IRSN), sin prácticamente mostrar afinidad por los receptores histamínicos, adrenérgicos y muscarínicos, responsables de los efectos secundarios de los ATC.

## Mecanismos implicados en el retraso de la acción terapéutica de los antidepresivos clásicos

La lentitud de la acción clínica de los tratamientos antidepresivos podría hacer pensar que es un tiempo necesario por los mecanismos biológicos involucrados para que el cerebro pueda hacer el cambio a un estado no depresivo y que, por tanto, el retraso en la acción terapéutica es inevitable. O, por el contrario, la latencia de acción clínica es una limitación propia de los fármacos anteriormente descritos. La primera postura podría parecer aceptable si tenemos en cuenta que, a pesar de tener distintos mecanismos de acción, la mayoría de los fármacos antidepresivos comercializados hasta la fecha son de acción lenta. Sin embargo, actualmente se han podido estudiar nuevas estrategias antidepresivas cuya acción es rápida (ver apartado 1.4.5) demostrando que **sí es posible una mejoría inmediata en pacientes con TDM**.

Por su parte, los fármacos antidepresivos clásicos, activan diversos **mecanismos adaptativos tanto presinápticos como postsinápticos** que son responsables de su acción lenta.

Por un lado, tanto el bloqueo de SERT por dosis clínicas de los TCA, SSRI y SNRI así como la inhibición de la MAO por los IMAOs no produce, en primera instancia, el aumento de 5-HT esperado sino el efecto opuesto debido a **la acción autoinhibidora del autoreceptor 5-HT<sub>1A</sub>**. Este receptor se expresa en neuronas piramidales y GABAérgicas de regiones corticales y límbicas, y también, **a alta densidad, en los núcleos del rafe (NR)**, donde se encuentran los somas de las neuronas 5-HT (Pompeiano et al., 1992; Spies et al., 2015). La activación del autoreceptor 5-HT<sub>1A</sub> por la 5-HT o agonistas específicos abre canales de potasio (K<sup>+</sup>), lo que reduce el potencial de membrana y la frecuencia de descarga de las neuronas 5-HT, efecto que se traduce en una reducción de la liberación de 5-HT en todo el cerebro.



Además, esta área del cerebro medio presenta las **mayores densidades de SERT y MAO** tanto en roedores como en humanos (Cortés et al., 1988; Fuxe et al., 1983; Saura et al., 1992, 1996). Estos dos factores hacen que los fármacos antidepresivos tengan una **acción preferente sobre los NR** en comparación con áreas más rostrales como la CPF o el hipocampo, zonas claves para el efecto antidepresivo, invadidas por los terminales de las fibras 5-HT (Adell & Artigas, 1991; Bel & Artigas, 1992; Celada & Artigas, 1993; Hervás & Artigas, 1998). De tal manera que dosis bajas de SSRI, análogas en roedores a las dosis usadas clínicamente, aumentan la 5-HT extracelular sólo en los NR (Hervás & Artigas, 1998). La 5-HT en estos casos no llega a aumentar en las áreas de proyección, sino que **reduce su liberación en esas zonas debido a que ese aumento de 5-HT en el rafe activa los autoreceptores 5-HT<sub>1A</sub> hiperpolarizando las neuronas 5-HT** y, por tanto, atenuando la liberación de 5-HT en las áreas de proyección como la CPF. Por otra parte, un tratamiento repetido a las mismas dosis produce un aumento significativo de la 5-HT extracelular en áreas del cerebro anterior (Bel & Artigas, 1993) inducido por la **desensibilización de los autoreceptores 5-HT<sub>1A</sub> tras el tratamiento repetido con antidepresivos** (Blier & de Montigny, 1994; Hervás et al., 2001). Todo esto nos indica que la mejora en la sintomatología aparecería una vez pasado el tiempo necesario para la desensibilización de los autoreceptores 5-HT<sub>1A</sub>. Un fenómeno análogo, aunque de menor importancia cuantitativa, ocurre con los autoreceptores 5-HT<sub>1B</sub>, localizados en terminales axonales, que inhiben localmente la liberación de 5-HT. Así, tanto el bloqueo de los autoreceptores 5-HT<sub>1A</sub> como de los 5-HT<sub>1B</sub> potencia el aumento de 5-HT extracelular inducido por los SSRI (Artigas et al., 2001).

Por otra parte, la **neurogénesis hipocampal** también parece ser un factor necesario para la aparición de los efectos antidepresivos tras la administración del tratamiento farmacológico. Prácticamente todos **los antidepresivos incrementan la proliferación y maduración de nuevas células hipocampales** e incrementan su supervivencia en roedores, incrementando la plasticidad neuronal en el giro dentado (Duman et al., 2001; 1999; Malberg & Duman, 2003; Wang et al., 2008). Sin embargo, este efecto sólo aparece tras un tratamiento mantenido (Duman et al., 2001; Wang et al., 2008). No sólo se ha demostrado que la **5-HT puede aumentar la neurogénesis**, sino que además el **receptor 5-HT<sub>1A</sub> (5-HT<sub>1A</sub>-R) tiene un papel fundamental** en este proceso, puesto que la proliferación celular en el giro dentado que ocurre tras 3 semanas de tratamiento en roedores no aparece en ratones *knock-out* para dicho receptor (Duman et al., 2001). Se ha sugerido que la **causa del retraso terapéutico de los tratamientos antidepresivos puede ser el**

**tiempo que tardan las nuevas neuronas en el giro dentado en extender sus neuritas e integrarse por completo de manera funcional en la circuitería cerebral** (Jacobs et al., 2000).

También se ha observado un efecto trófico de los antidepresivos, lo que puede provocar una mejora en la plasticidad neuronal a través de la **modulación de cascadas intracelulares neurotróficas (CREB; cAMP response element-binding protei)**, las cuales median la transcripción del gen **BDNF** (Boku et al., 2018; Masi & Brovedani, 2011). Todo ello afecta a la arquitectura neuronal, sobre todo en vías cortico-límbicas. No se verían efectos antidepresivos hasta conseguir la **mejoría en neuroplasticidad y en el funcionamiento de la conectividad cerebral** a través de dichos procesos y de ahí la lentitud de la acción de estos fármacos, fenómenos que se suman al tiempo necesario para desensibilizar los autoreceptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>1B</sub> (mecanismo presináptico).

### Nuevas estrategias antidepresivas de acción rápida

En las últimas décadas se ha puesto énfasis en estudiar otras opciones de tratamiento que consigan obtener una mejoría más rápida y eficaz que con los fármacos convencionales.

La **DBS en la CCAv** (también llamada Cg25) ha resultado ser **eficaz** para la mejora de la sintomatología depresiva y, además, de **manera inmediata** en pacientes resistentes al tratamiento convencional, **revirtiendo la hiperactivación de la CCAv** observada en estos pacientes (**Figura 3**) (Mayberg et al., 2005; Puigdemont et al., 2012, 2015). En estos estudios se observa un pequeño efecto rebote justo después de la inmediata mejoría, al que le sigue de nuevo una mejoría más lenta y mantenida. Investigaciones preclínicas han relacionado esa mejoría inicial con fenómenos inflamatorios debidos a la implantación de los electrodos (Perez-Caballero et al., 2014), sin embargo, la mejoría mantenida final se ha asociado a **plasticidad neuronal derivada de la DBS** en ciertos circuitos neuronales, haciendo énfasis en el **sistema 5-HT** (Veerakumar et al., 2014).

Por otra parte, la infusión endovenosa de **KET**, antagonista no competitivo del receptor de glutamato NMDA, puede producir una **significativa reducción de los síntomas depresivos de manera rápida** (Berman et al., 2000; Krystal et al., 2019; Zarate et al., 2006). Este compuesto ramificado contiene por igual (R)- Ketamina y (**S**)- **Ketamina**, siendo esta última aprobada en 2019 como antidepresivo en Estados Unidos y Europa administrada de manera intranasal.

Tras la aparición de los primeros estudios clínicos, numerosos equipos de investigación han desarrollado estudios para clarificar los mecanismos de acción antidepresiva de KET y poderlo diferenciar de su mecanismo de acción psicotrópica. La KET se desarrolló como anestésico disociativo en los años 1950 y se sigue usando como anestésico y como analgésico, y también como droga de abuso, debido a sus efectos psicotrópicos a dosis sub-anestésicas. Este último efecto también llevó a usar KET como modelo de esquizofrenia, ya que sus efectos psicotrópicos se revierten por fármacos antipsicóticos (Krystal et al., 2003)

Entre los numerosos estudios desarrollados, destacan los realizados por el equipo de R.S. Duman en la Universidad de Yales, USA, que muestran que la KET induce fenómenos de neuroplasticidad en CPF (Li et al., 2010). Por otra parte, se ha observado una **normalización de la hiperactividad glutamatérgica en la CCAv** de pacientes con TDM tras la administración intravenosa de KET (Morris et al., 2020). Además, la administración intraperitoneal de KET revierte el fenotipo depresivo en ratones con una corteza infralímbica (IL) hiperactiva (IL en roedores es el área equivalente a la CCAv en humanos) (Fullana, Gasull-Camós et al., 2020).

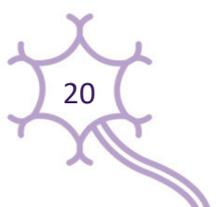
Finalmente, se ha estudiado en los últimos años el potencial efecto antidepresivo de acción rápida de **moduladores alostéricos positivos del receptor GABA<sub>A</sub> (GABA<sub>A</sub>-R)**, como la brexanolona y la zuranolona, los cuales han resultado efectivos para tratar la depresión postparto (Gunduz-Bruce et al., 2022) y están siendo estudiados para tratar el TDM (Althaus et al., 2020; Gunduz-Bruce et al., 2019). Podemos inferir que, al potenciar la acción GABAérgica, estos compuestos ayudarían a normalizar la actividad de la CCAv reduciendo la hiperactivación en pacientes con TDM.

# CORTEZA PREFRONTAL

## Localización y función

---

La CPF se ubica en la **zona más anterior del lóbulo frontal**, y constituye el **30% de toda la corteza cerebral** (Carlén, 2017). No sólo es el área cerebral más recientemente desarrollada filogenéticamente, sino que en términos de ontogenia también alcanza su madurez tardíamente ya que, aunque comienza a formarse en la cuarta semana prenatal, no completa su total desarrollo hasta muchos años después, en la adolescencia (Huttenlocher & Dabholkar, 1997; Paus et al., 1999).



La CPF juega un papel clave en las **funciones ejecutivas**. Gracias a ella se forma nuestra **personalidad**, podemos **tomar decisiones**, orientar nuestros comportamientos a la **obtención de metas** concretas, **planificar**, predecir consecuencias, **controlar impulsos** e inhibir respuestas automáticas, adaptarnos a las situaciones y **desarrollar estrategias**

No toda la CPF está involucrada de la misma forma en las distintas funciones en las que está implicada. Asimismo, las **zonas más dorsales se han relacionado con funciones cognitivas**, mientras que generalmente las áreas de **la parte más ventral de la CPF están asociadas al control y regulación emocional**.

## División funcional de la corteza prefrontal

---

Tanto la CPF como sus subdivisiones **no son estructuras con bordes anatómicos claramente identificados y uniformes**, por ello en la literatura podemos encontrar que distintos autores dividen la CPF de maneras diferentes. La gran variabilidad citoarquitectónica, tanto entre especies como entre individuos de la misma especie, ha sido un gran obstáculo que ha hecho confusa su definición (Fuster, 2008). Es por esto que desde hace tiempo se ha utilizado como criterio principal de identificación la distribución de las fibras talámicas, rasgo compartido entre distintas especies. Así, se define la CPF como **el área cortical de proyección del núcleo dorsomedial del tálamo**.

Desde el punto de vista funcional, gran parte del papel jugado por la CPF y sus distintas regiones se ha obtenido a través de las observaciones en pacientes con lesiones neurológicas. El primer caso documentado (1848) fue el de Phineas Gage, trabajador del ferrocarril en EEUU a quien una barra de hierro perforó el lóbulo frontal tras una explosión. Phineas sobrevivió al accidente, pero experimentó drásticos cambios de personalidad (ver Fuster, 2008)

A su vez, podemos dividir la CPF en 3 zonas principales (**Figura 6**):

**Corteza orbitofrontal (COF)**: Situada en la superficie ventral de la CPF. Lesiones en esta área suponen **cambios en la personalidad** y un comportamiento desadaptativo debido a fallos en la realización **de conductas orientadas a la consecución de metas** (Berlin et al., 2004; Rudebeck & Rich, 2018).

**Corteza prefrontal medial (CPFm)**: Lesiones en esta área pueden producir **apatía, desinterés** en el ambiente y **problemas de concentración** en tareas cognitivas o comportamentales (Fuster, 2008). A su vez, la parte medial de la CPF puede dividirse en dos zonas:

- *Corteza prefrontal dorsomedial (CPFdm)*: Esta área se ha visto involucrada en el **procesamiento del sentido del yo, la percepción que tenemos de nosotros mismos y de los demás, el comportamiento altruista y la teoría de la mente** (capacidad cognitiva adquirida en torno a los 3 o 4 años de edad que nos permite inferir los pensamientos de los demás y que estos estados mentales ajenos pueden ser distintos a los propios), entre otros (Frith & Frith, 2006; Gusnard et al., 2001; Waytz et al., 2012; Wittmann et al., 2021).
- *Corteza prefrontal ventromedial (CPFvm)*: También llamada **CCAv**, en la que encontramos la **corteza cingulada anterior subgenual o área 25 de Brodmann (Cg25)**. Tiene un papel clave en el **procesamiento de la recompensa** y la toma de decisiones basada en el valor que se le da a ese incentivo (Hiser & Koenigs, 2018).

De manera similar ejerce una función de gran importancia en la **regulación de emociones negativas**, siendo necesaria para la **extinción del miedo condicionado** (Milad & Quirk, 2002; Quirk et al., 2000), así como para **evitar la sobregeneralización del miedo** (Xu & Südhof, 2013).

Por otra parte, la CPFvm también está involucrada en el alivio del dolor a través de un placebo (Atlas & Wager, 2014). Además, cabe recordar la **hiperactivación de la CPFvm observada en pacientes con TDM** resistentes al tratamiento antidepresivo convencional, mencionada anteriormente (sección 1. 3.5) (Drevets et al., 2008; Mayberg et al., 2005) que concuerda con otros estudios donde se observa que las personas con **lesiones en la CPFvm son menos susceptibles a desarrollar TDM y trastorno de estrés postraumático** (Koenigs, Huey, Calamia, et al., 2008; Koenigs, Huey, Raymond, et al., 2008).

La CPFvm también se ha visto implicada en funciones cognitivas sociales que son relevantes en diversos trastornos mentales, como por ejemplo la **empatía, el reconocimiento facial de emociones, la cognición y juicio moral**, etc (Fumagalli & Priori, 2012; Heberlein et al., 2008; Shamay-Tsoory et al., 2009).

Así mismo, también participa junto con otras estructuras (entre ellas la CPFdm) en el **procesamiento de información relacionada con uno mismo**, como identificar si cierto rasgo de personalidad te pertenece, imaginar qué sentirías en una situación hipotética o recordar memorias autobiográficas (Hiser & Koenigs, 2018; Northoff et al., 2006; Svoboda et al., 2006).

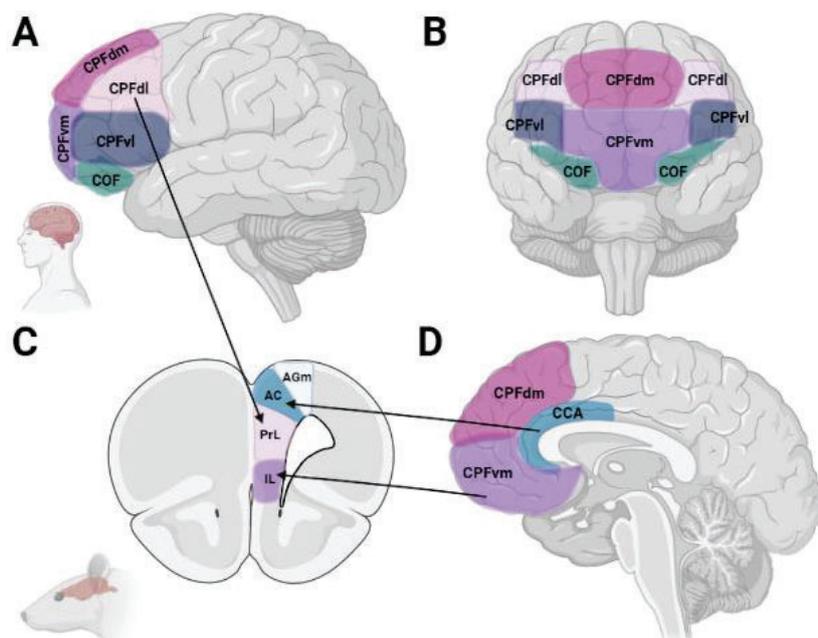
**Corteza prefrontal lateral (CPFL):** Las lesiones en la parte más lateral de la CPF se caracterizan sobre todo por déficits cognitivos. La CPFL es fundamental para la **organización y ejecución del comportamiento, el habla y el razonamiento**, estando también implicada en la capacidad de planificación y de llevar a cabo secuencias concretas de acciones (Fuster, 2001). Podemos dividir la **CPFL en dos zonas, una dorsal y otra ventral:**

- **Corteza prefrontal dorsolateral (CPFdl):** Esta zona corresponde principalmente al área 46 de Brodmann y está involucrada en **procesos atencionales**, así como en la **memoria de trabajo** (memoria operativa o de corto plazo; *working memory*) y **memoria de fuente** (Cui et al., 2020; Gallo et al., 2010; Petrides, 2000). Por otro lado, es clave en la modulación de **sesgos cognitivos** y en el **procesamiento del lenguaje** (Hertrich et al., 2021; Xia et al., 2021).
- **Corteza prefrontal ventrolateral (CPFvl):** Se le ha relacionado con la **agresividad inducida por frustración** (Gallucci et al., 2020), con la **toma de decisiones** (Sakagami & Pan, 2007) y con la **reevaluación positiva ante eventos estresantes** o negativos (Cao et al., 2021).

Para poder estudiar en profundidad las propiedades de las distintas áreas cerebrales, y con la salvedad de la enorme diferencia en cuanto a su complejidad, se han establecido ciertas **homologías entre las subdivisiones de la CPF en humanos y la CPF de roedores (Figura 6).**

Así pues, en el cerebro de rata, al igual que en el cerebro humano, pueden distinguirse 3 partes principales de la CPF: lateral, orbital y medial (CPFm). La **CPFm** en roedores, a su vez se divide en 4 áreas. Las dos áreas más dorsales de la CPFm en roedores son el **área agranular medial (AGm)** y la **cingulada anterior (*anterior cingulate, AC*)**, seguidamente en dirección dorsoventral encontraríamos el **área prelímbica (PrL)** y, por último, en la zona más ventral, se sitúa el **área infralímbica (IL).**

Cabe destacar que la CPF de roedores no presenta capas granulares y en su citoarquitectura no encontramos la capa cortical IV que sí vemos en primates. En términos de conectividad y función **la corteza PrL ha sido considerada la homóloga a la CPFdl en primates/humanos, mientras que la IL cumple funciones y comparte patrones de conectividad con la CPFvm.**



**Figura 6. Subdivisiones de la corteza prefrontal (CPF) y analogías con la CPF de roedores. A. y B.** Visión lateral y frontal, respectivamente, del cerebro humano con las subdivisiones más importantes de la CPF. **C.** Corte coronal de cerebro de rata (AP: +3.2mm de bregma) con las subdivisiones de la CPF medial. **D.** Corte sagital del cerebro humano con las subdivisiones de la CPF. Abreviaturas: CPFdm (CPF dorso medial), CPFdl (CPF dorso lateral), CPFvm (CPF ventro medial), CPFvl (CPF ventro lateral), COF (corteza orbito frontal), CCA (corteza cingulada anterior), AGm (área agranular medial), AC (área cingulada anterior), PrL (área prelímbica) e IL (área infralímbica).

## Citoarquitectura de la corteza prefrontal

Con respecto a la arquitectura encontramos un rasgo general que es común en todas las áreas corticales, entre ellas la CPF, el **orden estratificado de las células**.

De este modo a principios del siglo XX varios autores, como Santiago Ramon y Cajal y Korbinian Brodmann describieron en la corteza cerebral 6 capas con características distintas. Estas capas son enumeradas (capas I-VI) desde la parte más externa, en la superficie cerebral justo bajo la piamadre, hasta la zona más profunda. Sin embargo, durante el desarrollo cerebral, el orden de formación es inverso, desarrollándose en primer lugar las capas más profundas hasta que se forma por último la capa I. A continuación, una breve descripción de su composición celular y conectividad (**Figura 7**):

**Capa I o capa molecular o plexiforme:** Es la capa más externa y está formada por **células de Cajal–Retzius** (células multipolares con disposición horizontal, en paralelo con la superficie cerebral)(Ulfig,

2002), los penachos de las **dendritas apicales de neuronas piramidales** situadas en otras capas (Marín-Padilla, 1990), **neuronas GABAérgicas** (Zecevic & Rakic, 2001) y **axones procedentes del tracto aferente tálamo-cortical** (Rubio-Garrido et al., 2009).

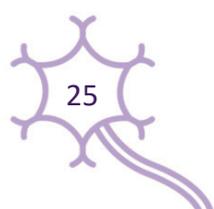
**Capa II o capa granular externa:** Está constituida por **células estrelladas** que dan el aspecto granular. Además, también se encuentran **pequeñas neuronas piramidales** (Patesta & Gartner, 2013) e **interneuronas GABAérgicas doble-bouquet** que expresan calretinina y somatostatina y que inervan tanto a otras células GABAérgicas como a las dendritas de células piramidales (Lewis & González-Burgos, 2008).

**Capa III o capa piramidal externa:** Contiene **neuronas piramidales** que proyectan hacia otras áreas corticales, particularmente del **hemisferio contralateral**. También se encuentran en ella **interneuronas GABAérgicas** que expresan parvalbumina, las cuales suelen situarse cerca de los somas de las neuronas piramidales haciendo sinapsis en el segmento inicial del axón de estas (Lewis & González-Burgos, 2008).

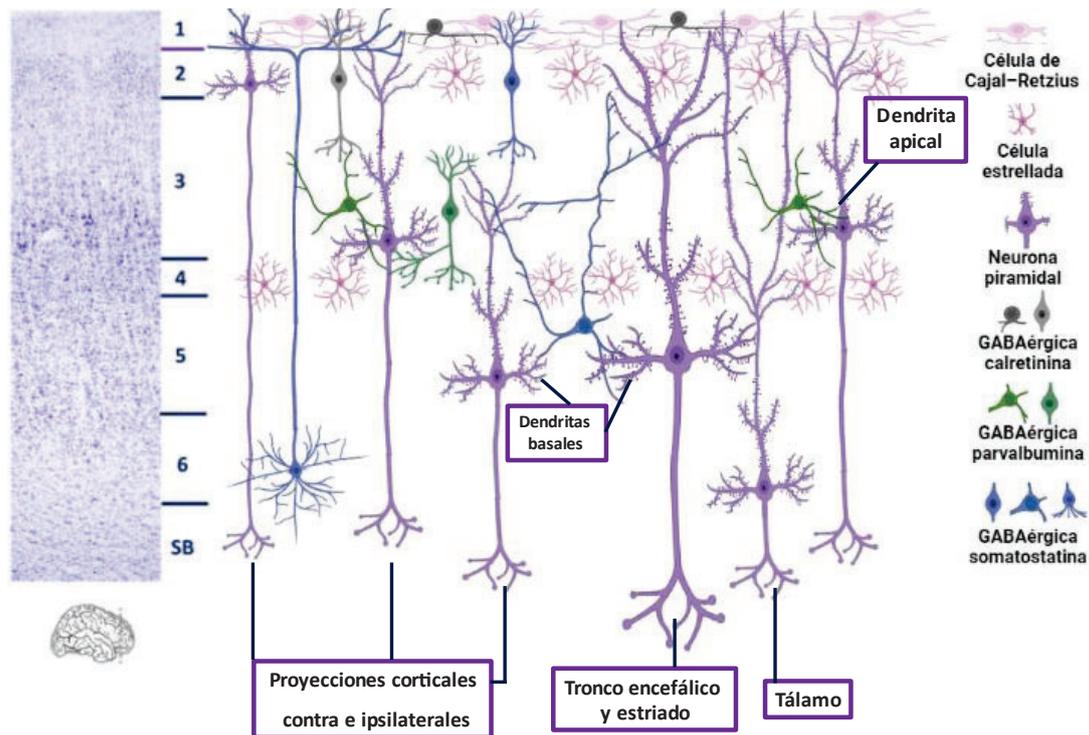
**Capa IV o capa granular interna:** Esta capa existe en la mayor parte de la corteza cerebral, pero se halla **ausente en la CPF de roedores**. En el resto de la corteza, la capa IV recibe la mayor parte de las **aferencias tálamo-corticales**, cuya información las neuronas estrelladas se encargan de distribuir a capas III y V. Sin embargo, dada su ausencia en la CPF de roedores, las aferencias del núcleo dorsomedial del tálamo inervan capas III, V y VI, sobre todo estas dos últimas (Kuroda et al., 1998).

**Capa V o capa piramidal interna o ganglionar:** En ella se encuentran una gran cantidad de **células piramidales grandes** que constituyen la fuente principal de **salidas subcorticales**. En ella se encuentran los somas de las neuronas piramidales que proyectan a los núcleos del rafe dorsal (NRD) y área tegmental ventral (ATV) (Gabbott et al., 2005), así como al locus coeruleus (LC) (Branchereau et al., 1996; Takagishi & Chiba, 1991), siendo la capa cortical más importante para las conexiones entre la CPF y los **núcleos monoaminérgicos**.

Así mismo, las neuronas piramidales de capa V presentan una **conexión recíproca con las piramidales de capa III** (DeFelipe & Fariñas, 1992). Como en todas las demás capas corticales, también encontramos **interneuronas GABAérgicas**, sobre todo aquellas que expresan somatostatina, las cuales hacen sinapsis con dendritas distales de neuronas piramidales (Lewis & González-Burgos, 2008).



Capa VI o capa multiforme o polimórfica: Es la capa más profunda de la corteza, que se mezcla con la sustancia blanca subcortical. En ella predominan las **células fusiformes**, aunque también se encuentran diversos tipos de **neuronas piramidales e interneuronas GABAérgicas**. Los axones de la mayor parte de las neuronas de esta capa se caracterizan por formar **fibras de proyección corticotalámicas**, aunque también predominan las **neuronas piramidales con largos axones dispuestos de manera horizontal que conectan con otras áreas corticales** (Thomson, 2010).



**Figura 7. Citoarquitectura de la corteza prefrontal.** De izquierda a derecha: 1. Tinción de Nissl de una sección coronal de la corteza prefrontal dorso lateral (CPFdl, área 46 de Brodmann) de un cerebro humano (Modificado de Zikopoulos et al., 2018). 2. Esquema de las las distintas capas corticales. 3. Ilustración de los tipos neuronales representativos en cada capa cortical, así como de sus áreas de proyección. 4. Identificación de los tipos neuronales representados.

Las **células piramidales** representan entre un **75-80%** de todas las neuronas de la corteza cerebral. Liberan el neurotransmisor **glutamato** y se consideran la **mayor fuente de sinapsis excitatorias** intrínsecas en corteza, siendo sus espinas dendríticas la **principal diana postsináptica de las sinapsis excitatorias** (Elston et al., 2011). Su nombre está relacionado con la forma característica de su soma que es piramidal. Además, se caracterizan por tener una **dendrita apical** que penetra en

las capas superiores de manera perpendicular a la superficie y que le permite recibir información procedente de dichas capas. Otras dendritas adicionales, las **dendritas basales**, se disponen de manera horizontal paralelas a la superficie y nacen en la base del cuerpo celular.

Algunas neuronas piramidales poseen un axón corto que termina en otras capas corticales (suelen encontrarse en neuronas piramidales de capa III), sin embargo, otras tienen un largo axón que pasa el final de la corteza entrando en la materia blanca y proyectan hacia estructuras subcorticales distales, como el mesencéfalo, el tronco del encéfalo o la médula espinal (estas son más abundantes en capas profundas V y VI).

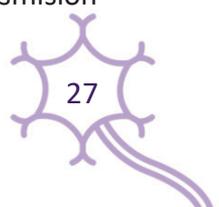
Por otro lado, las **interneuronas GABAérgicas** forman el **20-25%** restante de neuronas de la corteza cerebral y se encargan de controlar de manera eficiente la actividad de las neuronas piramidales **inhibiendo** su actividad, ya que **liberan ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA)**, principal neurotransmisor inhibitorio en el SNC. Estas células están presentes en todas las capas corticales, aunque se encuentran en mayor proporción en las capas mediales. Forman una **población celular muy heterogénea** que presenta diversas propiedades morfológicas, bioquímicas, electrofisiológicas y de conectividad (DeFelipe et al., 2013; L. Lim et al., 2018; Petilla Interneuron Nomenclature Group et al., 2008). Sus axones son de corta longitud y, por tanto, su función es totalmente local y queda restringida a la propia corteza. Sin embargo, se han identificado neuronas GABAérgicas corticales de largo alcance o *long-range* cuyas dianas son áreas alejadas de su cuerpo celular como por ejemplo el estriado, el núcleo accumbens o la amígdala (Jinno & Kosaka, 2004; Lee et al., 2014)(ver revisión: Urrutia-Piñones et al., 2022).

## Neurotransmisión en la corteza prefrontal

---

Se han identificado numerosos neurotransmisores en CPF, destacando entre ellos los aminoácidos **glutamato y GABA**, las **monoaminas (NA, DA y 5-HT)**, **acetilcolina**, así como **histamina**, **orexina y diversos neuropéptidos**. Por su interés en TDM y en su tratamiento, describiré de forma breve los sistemas de neurotransmisión por glutamato, GABA y monoaminas.

Tal como se describe en el apartado 1.4., los fármacos antidepresivos convencionales inhiben el catabolismo de las monoaminas a través de la MAO o bloquean sus transportadores neuronales, potenciando de ese modo la activación de receptores pre- y postsinápticos de NA, DA y 5-HT. Por otra parte, las nuevas estrategias antidepresivas de acción rápida están basadas en el antagonismo de receptores glutamatérgicos (KET, antagonista NMDA) o en la potenciación de la neurotransmisión



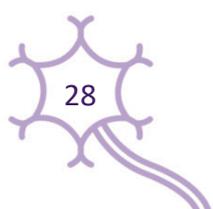
GABA<sub>A</sub> a través de moduladores alostéricos como la brexanolona o la zuranolona. Por su especial interés en esta Tesis, describiré de forma algo más amplia el sistema de neurotransmisión 5-HT.

**Glutamato:** Es **el neurotransmisor excitatorio** más importante y abundante en todo el sistema nervioso y se encuentra en grandes cantidades sobre todo en la CPF (Peinado et al., 1984). Es el neurotransmisor empleado por **las neuronas piramidales** de capas superiores (II–III) para sus conexiones intra-corticales y por las de capas inferiores (V–VI) para sus conexiones cortico-subcorticales. Asimismo, las **neuronas talámicas** usan glutamato como neurotransmisor (con la excepción de las del núcleo reticular, de tipo inhibitorio, que no proyectan a corteza), por lo que todas las aferencias y sinapsis tálamo-corticales son también de naturaleza glutamatérgica.

Se han caracterizado 4 grandes tipos de receptores de glutamato: **AMPA, NMDA, Kainato y receptores metabotrópicos (mGluR) (Figura 8)**, de algunos de los cuales existen diversos subtipos con características diversas. Los 3 primeros tipos son de carácter **ionotrópico** y ejercen acciones rápidas sobre el potencial de membrana de las neuronas en las que se hallan situados gracias al aumento de la permeabilidad a cationes como sodio o calcio (receptores AMPA y NMDA, respectivamente). La activación de receptores **AMPA abre canales de Na<sup>+</sup>**, lo que se traduce en un rápido aumento de las corrientes sinápticas y del potencial de membrana, fenómeno que se desensibiliza rápidamente.

Por su parte, la composición y estructura del canal iónico **NMDA** hace que su **activación por glutamato y la posterior entrada de iones Ca<sup>2+</sup> solo sea posible tras la liberación de un ion de magnesio** que ocluye el canal en situación de reposo. Por ello, las acciones de glutamato sobre este receptor solo ocurren en neuronas previamente despolarizadas por la activación de receptores AMPA. Los receptores NMDA están implicados en fenómenos de **potenciación y depresión a largo plazo que subyacen los procesos de memoria y otras funciones cognitivas** en las que la CPF está implicada.

Por otra parte, los **mGluR**, de los que hay 8 tipos (**mGluR<sub>1</sub> a mGluR<sub>8</sub>**), agrupados en tres familias, median acciones metabotrópicas lentas de tipo **excitador (mGluR<sub>1</sub> y mGluR<sub>5</sub>) o inhibitor (el resto)**. Dichos receptores pertenecen a la gran familia de receptores **acoplados a proteínas G**, análogos a los receptores de las monoaminas (con excepción del 5-HT<sub>3</sub>-R, de naturaleza iónica).



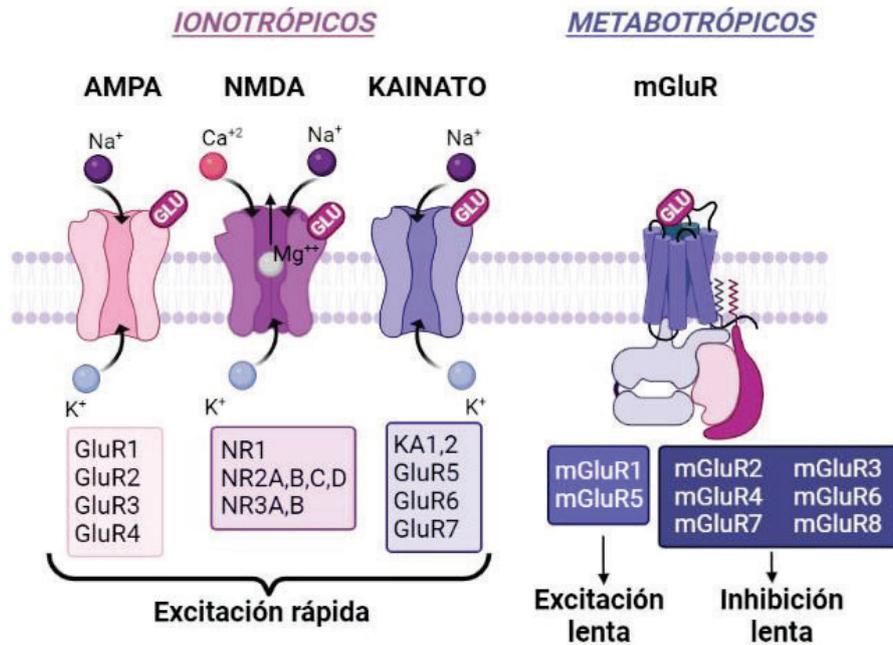


Figura 8. Tipos de receptores de glutamato

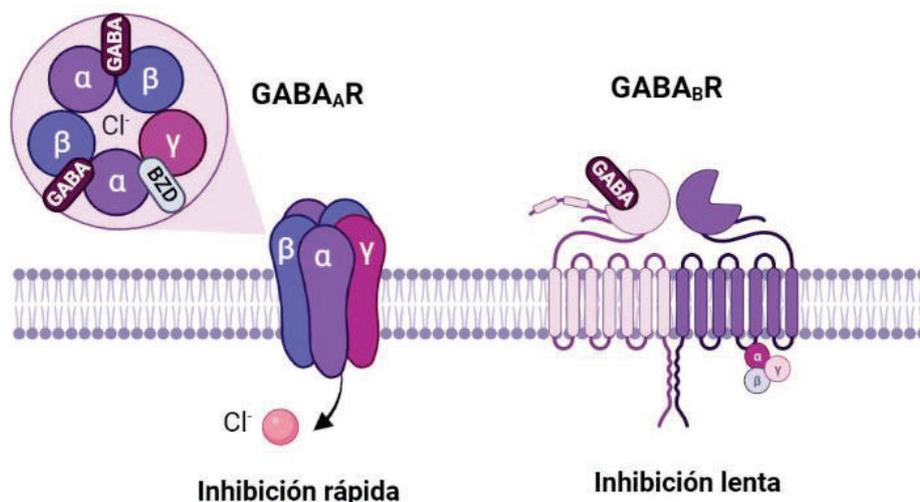
**GABA:** El GABA es el **principal neurotransmisor inhibitorio** y el más abundante de todos en el SNC. Tanto en la CPF como en otras áreas corticales, la mayor parte de las sinapsis GABAérgicas proceden de interneuronas locales de diversos tipos que modulan la actividad de las neuronas piramidales de proyección (DeFelipe et al., 2013). Sin embargo, se han identificado proyecciones GABAérgicas hacia la CPF desde zonas subcorticales como el ATV (Carr & Sesack, 2000), la región basal del cerebro medio (Henny & Jones, 2008; Sarter & Bruno, 2002) o el NRD (Bang & Commons, 2012a). Existen dos tipos principales de receptores GABA: **GABA<sub>A</sub>-R** y **GABA<sub>B</sub>-R** (Figura 9).

El primero de ellos (**GABA<sub>A</sub>-R**) es un **receptor ionotrópico transmembrana permeable a cloro**. Su localización suele ser **postsináptica** y su acción al abrirse tras la unión de un ligando hace que la neurona se hiperpolarice por la entrada de iones  $\text{Cl}^-$ , reduciendo de este modo su actividad eléctrica. El ligando principal de este receptor es **GABA**, pero también presenta sitios de unión para otras moléculas como las **benzodiazepinas, alcoholes, neuroesteroides, barbitúricos y otros anestésicos**. Los receptores GABA<sub>A</sub> están formados por **5 subunidades** dispuestas de manera simétrica alrededor de un canal central (por el que pasarán los iones  $\text{Cl}^-$ ), generalmente son dos unidades  $\alpha$ , dos  $\beta$  y una unidad  $\gamma$ . Por un lado, el sitio de unión del GABA se encuentra en la parte extracelular entre una unidad  $\alpha$  y una  $\beta$ , mientras que las benzodiazepinas se unen al receptor entre las subunidades  $\alpha$  y las

y. Por otra parte, los sitios de unión de ciertos anestésicos (entre ellos los barbitúricos), neuroesteroides y alcoholes se encuentran en el dominio transmembrana.

Estos GABA<sub>A</sub>-R han sido relacionados con la **regulación de la ansiedad y el miedo** (Fuchs et al., 2017; Pan et al., 2022) y con la **dependencia al alcohol** y sus efectos negativos en la salud (Hughes et al., 2019; Olsen & Liang, 2017). A su vez, déficits en este receptor pueden provocar un **comportamiento ansioso y depresivo** mediado por la hiperactivación del eje HPA (Engin et al., 2018; Shen et al., 2010)

El segundo tipo de receptor GABA (**GABA<sub>B</sub>-R**) es un receptor **metabotrópico ligado a proteína G** que está constituido por dos subunidades GABA<sub>B1</sub> y GABA<sub>B2</sub> formando un heterodímero. Se localizan **pre- y postsinápticamente** y modulan **canales de Ca<sup>2+</sup> y K<sup>+</sup>** provocando una **inhibición lenta** de la neurona.



**Figura 9. Tipos de receptores GABA**

**Monoaminas:** Los sistemas de neurotransmisión aminérgicos, y en particular, los sistemas noradrenérgico, dopaminérgico y 5-HT poseen una serie de características anatómicas y funcionales comunes que les diferencian de la neurotransmisión por los aminoácidos glutamato o GABA. Así, las neuronas glutamatérgicas son habitualmente neuronas de proyección, con dianas neuronales distales muy específicas, constituyendo el *hardware* o cableado general del cerebro. La actividad excitatoria de las neuronas glutamatérgicas está controlada de forma local por interneuronas

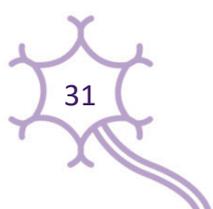
GABAérgicas, aunque también existen neuronas de proyección GABAérgicas en los ganglios basales y en algunas zonas corticales (Urrutia-Piñones et al., 2022).

Por el contrario, los **sistemas monoaminérgicos son altamente expansivos** desde un punto de vista anatómico, inervando zonas muy amplias del cerebro a partir de un reducido número de cuerpos celulares localizados en el tronco del encéfalo (p. ej., el cerebro humano contiene alrededor de 250.000 neuronas 5-HT, de un total de  $10^{11}$  neuronas, y el de rata unas 20.000 neuronas 5-HT (Jacobs & Azmitia, 1992)). Además, **dicha inervación es muy densa**, habiéndose calculado densidades superiores a  $10^6$  terminaciones nerviosas 5-HT por  $\text{mm}^3$  (revisado en Artigas, 2013). Dichos sistemas poseen una **descarga neuronal lenta y bastante regular** (sistemas tónicos) que en el caso de 5-HT y NA depende de los ciclos sueño -vigilia (ambos sistemas son Rem-off, es decir, cesan su actividad neuronal durante el sueño REM (Jacos y Azmitia, 1992)). El sistema DA presenta además una cierta actividad fásica, con descargas en ráfagas que aumentan la liberación de DA en las áreas de proyección.

Finalmente, y también a diferencia de los sistemas de glutamato y GABA, que actúan mayoritariamente a nivel sináptico, los sistemas monoaminérgicos **actúan de forma paracrina**, no sináptica (con la excepción de la 5-HT en los receptores 5-HT<sub>3</sub>), liberando el neurotransmisor al paso de los impulsos nerviosos por los axones. El neurotransmisor liberado puede entonces actuar en receptores postsinápticos en las cercanías del punto de liberación o bien ser internalizado de nuevo por el transportador neuronal correspondiente (NAT, transportador de NA; DAT, transportador de DA y SERT), que son la diana farmacológica de la mayor parte los antidepresivos.

Estas características anatómicas y funcionales hacen que los cambios de actividad neuronal a nivel de los cuerpos celulares en áreas muy discretas del tronco del encéfalo tengan una enorme repercusión en la liberación de las monoaminas en el resto del encéfalo y, por tanto, en las funciones cerebrales medidas por las mismas.

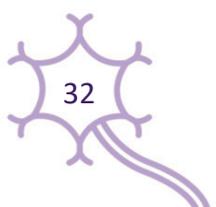
- **Noradrenalina (NA)**: Liberada por las neuronas procedentes del **LC**. Las fibras noradrenérgicas inervan todas las capas corticales, sin embargo, son más densas en las **capas IV y V** (Fuster, 2008). Encontramos 3 tipos principales de receptores adrenérgicos:  **$\alpha_1$**  y  **$\beta$**  (ambos excitatorios) y  **$\alpha_2$**  (autoreceptor inhibitorio). Las capas II a VI de la CPF expresan el receptor  **$\alpha_1$** , en mayor proporción en neuronas glutamatérgicas (Santana & Artigas, 2017b). El receptor  **$\alpha_2$**  se presenta en mayor densidad en las capas I/II y disminuye su expresión conforme aumenta la profundidad de la CPF



(Szot et al., 2007). Con respecto al receptor  $\beta$ , se le ha considerado responsable de la acción excitatoria de la NA en las neuronas piramidales de capa V (Grzelka et al., 2017).

- **Dopamina (DA):** Las fibras dopaminérgicas que llegan a la CPF proceden del **ATV** formando el **sistema dopaminérgico mesocortical** e inervan principalmente la zona ventral de la CPF. Estas fibras DA son especialmente densas en las **capas V y VI** de la corteza y su presencia es más pobre en capa IV (J. Fuster, 2008). El receptor de DA más abundante en la corteza es el **D<sub>1</sub>** (excitador), el cual es expresado mayoritariamente por interneuronas GABAérgicas en capas II-III y en capas profundas V y VI, mientras que el receptor **D<sub>2</sub>** (inhibidor), que es menos común, se concentra en la capa V de la corteza y es expresado en proporciones similares por neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas (Santana & Artigas, 2017b).
- **Serotonina (5-HT):** Este neurotransmisor se origina en los **NR** y sus fibras inervan todas las subdivisiones de la CPF ampliamente, en especial en las **capas más profundas V y VI** y también en la **capa I**, mientras que en capas corticales intermedias estas fibras están presentes en menor densidad (Linley et al., 2013). La mayor parte de neuronas del rafe que proyectan a la CPF se encuentran en la **zona rostral y central del NRD** y sus fibras se dirigen principalmente a la **CPFm**.

En la CPF podemos encontrar diversos tipos de receptores de serotonina (5-HT-R) (ver revisión en: Sargin et al., 2019)). Entre estos, los más abundantes son los **5-HT<sub>1A</sub>-R** (acción inhibitoria) y **5-HT<sub>2A</sub>-R** (función excitatoria) que se expresan tanto en neuronas piramidales como GABAérgicas de todas las capas corticales a excepción de capa I (Santana & Artigas, 2017b). El **5-HT<sub>2C</sub>-R** (excitatorio) aparece en neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas sobre todo en capas profundas V y VI, aunque también se ve en menor medida en capas superficiales (I-III) (Santana & Artigas, 2017a). Otro receptor que se expresa tanto en neuronas piramidales como GABAérgicas en la CPF es el **5-HT<sub>6</sub>-R** (función excitatoria) (Helboe et al., 2015). Por otra parte, el **5-HT<sub>3</sub>-R** (excitatorio; único canal iónico asociado a receptores monoaminérgicos) parece expresarse solamente en interneuronas GABAérgicas de capas superficiales (I-III) (Santana & Artigas, 2017b). Finalmente, los **5-HT<sub>4</sub>-R**, **5-HT<sub>7</sub>-R** (excitatorios) y **5-HT<sub>5A</sub>-R** (inhibitorio) son expresados sólo en las neuronas glutamatérgicas en la capa V (Béique et al., 2004; Feng et al., 2001; Goodfellow et al., 2012).



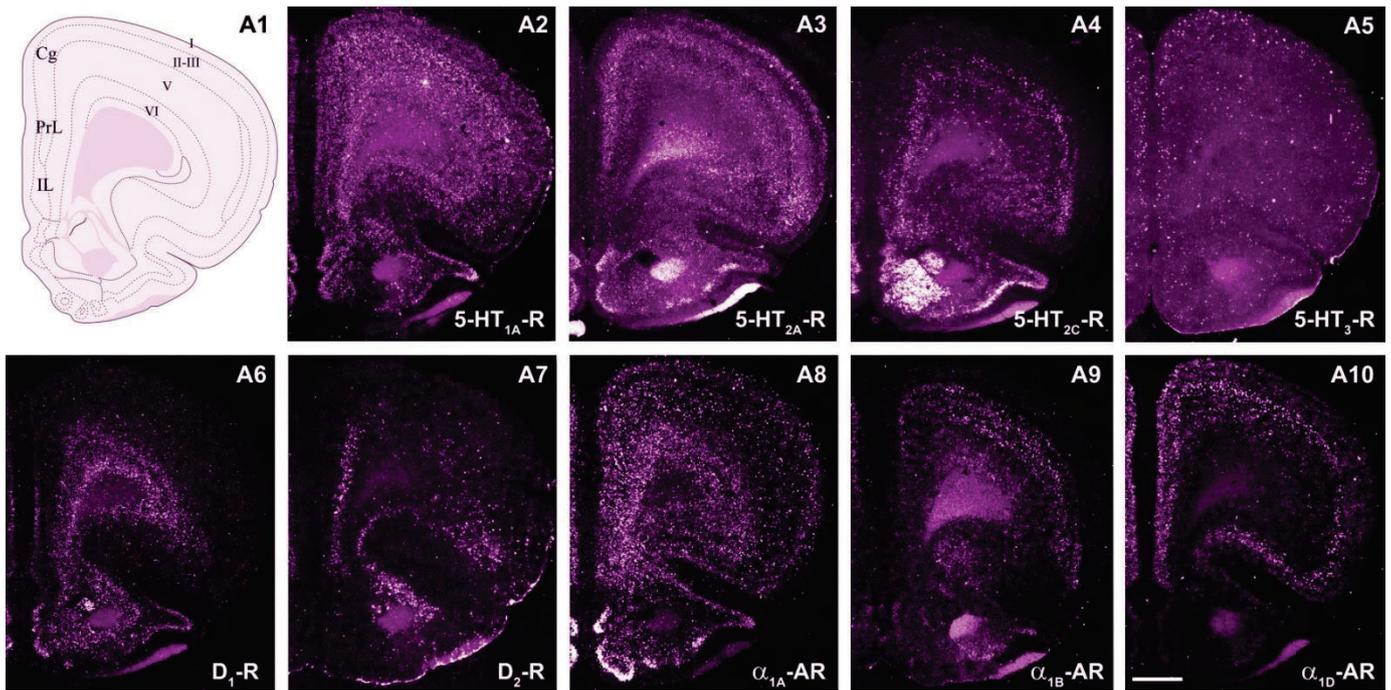


Figura 10. Imágenes de campo oscuro mostrando la expresión de ARNm de los principales receptores monoaminérgicos presentes en la corteza cerebral de rata. Modificado de Santana & Artigas, 2017. Barra = 1 mm.

## Conectividad de la corteza prefrontal

La CPF es considerada el área cerebral de **mayor nivel asociativo** y puede llevar a cabo las complejas funciones cerebrales superiores gracias a su **amplia conectividad** con otras áreas cerebrales tanto **corticales como subcorticales** sobre las que actúa orquestando su actividad mediante **un control jerárquico (top-down)** (Miller & Cohen, 2001)

En general la mayoría de las proyecciones de la CPFm tienen como objetivo el **hipotálamo lateral, el tálamo dorsomedial, el estriado ventral** (sobre todo fibras procedentes del área IL), el **estriado dorsal** (desde fibras situadas más dorsalmente en el área PrL) y la **amígdala basolateral** entre otras estructuras, siendo dichas proyecciones ipsi- y contralaterales en todos estos casos. Asimismo, existen abundantes proyecciones ipsilaterales a diversas áreas y núcleos del tronco del encéfalo, como **los NR, ATV, la sustancia gris periacueductal**, así como a la médula espinal. A diferencia del resto de proyecciones, originadas mayoritariamente en AC, PrL e IL, las proyecciones corticoespinales proceden mayoritariamente de la corteza motora secundaria (MOs), más dorsal que

la CA. Cabe destacar que la mayoría de estas fibras de proyección hacia zonas subcorticales provienen de **capas profundas de la corteza V y VI**, y en particular, aquellas que proyectan al tálamo, proceden fundamentalmente de capa VI (Gabbott et al., 2005).

A pesar de la cercanía anatómica y de que en muchos estudios no se ha hecho distinción entre las diferentes partes de la CPFm, son incuestionables las diferencias entre los patrones de conectividad de zonas más dorsales (e.j. AC o PrL) y más ventrales (IL) de la CPFm, salvo algunas excepciones como las proyecciones a tálamo y al cerebro anterior olfatorio que presentan proyecciones similares.

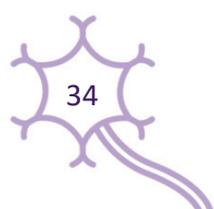
Estas diferencias se reflejan en la distinta funcionalidad de ambas áreas, siendo el área IL, homóloga a la CPFvm o Cg25 en humanos, a la que se le atribuyen funciones relacionadas con la regulación emocional y funciones visceromotoras, mientras que el área PrL, homóloga a la CPFdl en humanos, más relacionada con procesos cognitivos.

**Conectividad del área PrL:** Recibe información relacionada con la orientación espacial y el reconocimiento de objetos de prácticamente todas las modalidades sensoriales a través de fibras procedentes de las áreas asociativas auditivas, visuales y somatosensoriales de las **cortezas orbital, parietal, temporal y occipital y del área motora y premotora**, con las que presenta una fuerte conexión recíproca (Groenewegen & Uylings, 2000; Hoover & Vertes, 2007).

También recibe aferencias del **complejo amigdalino basal** que le proporciona información sensorial. Asimismo, las fibras de **tálamo** que inervan PrL reciben información procedente del tronco del encéfalo y cerebelo estando relacionados con información somatosensorial (Groenewegen & Uylings, 2000; Hoover & Vertes, 2007). Envía proyecciones a la **parte dorsal de los ganglios basales**, que está más relacionada con funciones cognitivas y motoras, y también inerva estructuras del **tronco encefálico** (Gabbott et al., 2005; Groenewegen & Uylings, 2000).

Con respecto a los núcleos monoaminérgicos, el área PrL recibe fibras del **LC**, presenta una densa conexión recíproca con el **ATV** y también con el **NRD** (Gabbott et al., 2005; Hoover & Vertes, 2007; Vertes, 2004).

**Conectividad del área IL:** Al contrario que en el área PrL, las aferencias a IL provienen casi en su totalidad de **estructuras límbicas corticales y subcorticales**. Aunque esta área también recibe entradas (o aferencias) de las cortezas de asociación somatosensorial, visual, auditiva y el cortex premotor, no son tan fuertes como en la PrL, situada más dorsalmente. Más densas son las



conexiones recíprocas que presenta esta área con las **cortezas asociativas olfatoria, gustativa y visceral** (Groenewegen & Uylings, 2000).

El área IL también recibe proyecciones directas desde estructuras límbicas como la **amígdala** y también del **hipocampo** (Hoover & Vertes, 2007; Seo et al., 2016). Además, es el punto de partida de fibras **cortico-amigdalinas** sobre todo desde la capa V (Gabbott et al., 2005). A su vez, proyecta a la **parte ventral de los ganglios basales**, relacionada con estructuras límbicas (Groenewegen & Uylings, 2000). Está interconectada con los núcleos monoaminérgicos **NRD, ATV y LC** y el **hipotálamo** (Gabbott et al., 2005; Hoover & Vertes, 2007; Vertes, 2004).

Además de las conexiones propias de cada área, **ambas partes de la CPFm (PrL e IL) están conectadas entre ellas controlando mutuamente su actividad**. La zona más ventral, IL, envía una gran cantidad de fibras hacia PrL. Por su parte, PrL no proyecta tan densamente a IL (Hoover & Vertes, 2007). Se ha observado que la función que ejercen entre ellas es principalmente inhibitoria, por lo que existiría un **control recíproco de tipo inhibitor entre el área afectiva y el área cognitiva de la CPF (CPFvm y CPFdl, respectivamente)** (Ji & Neugebauer, 2012; Saffari et al., 2016) de tal manera que la activación de una de las dos áreas inhibe la actividad de las neuronas piramidales de la otra. Esto explicaría cómo la **hiperactivación de la CPFvm** (parte afectiva) en pacientes con TDM se presenta al mismo tiempo que una **hipoactivación en la CPFdl** junto con la correspondiente disfunción cognitiva (Ramirez-Mahaluf et al., 2015).

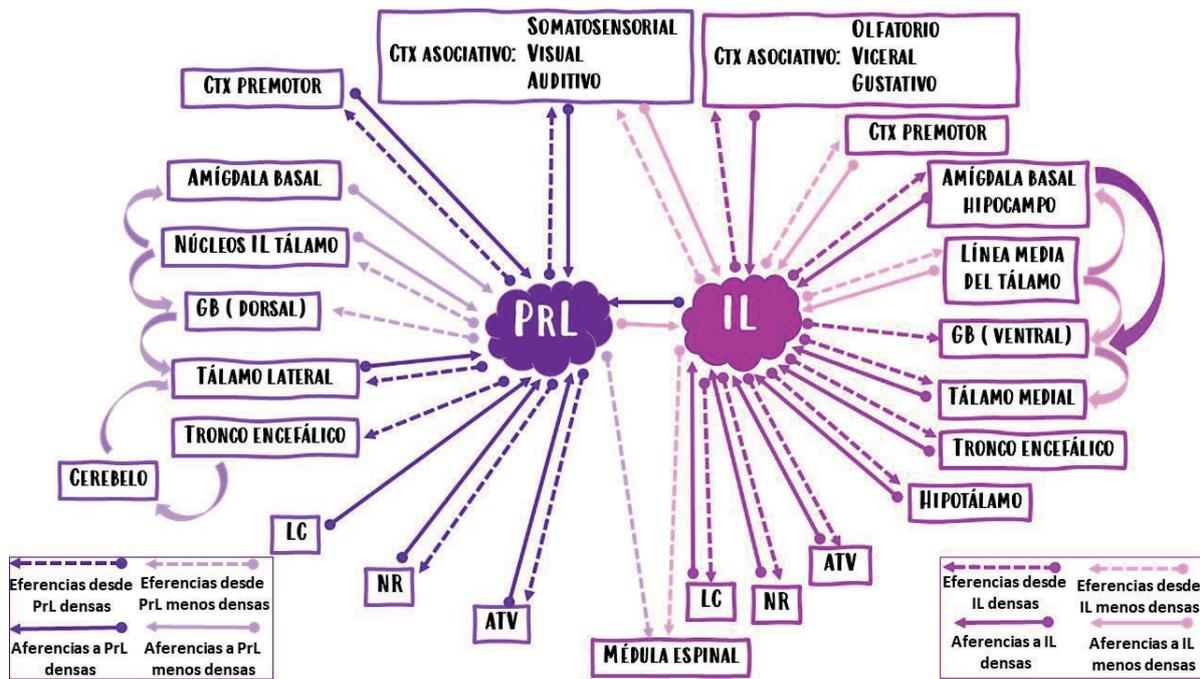


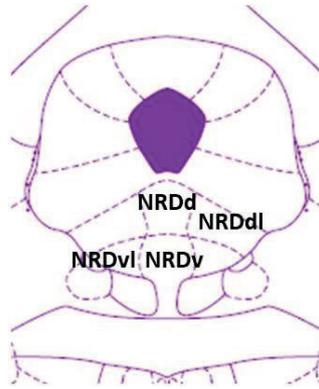
Figura 11. Conectividad principal del área prelímbica (PrL) e infralímbica (IL) de la corteza prefrontal medial (CPFm). Abreviaturas: Ctx: Corteza; Núcleos IL: Núcleos intralaminares; GB: Ganglios basales; LC: locus coeruleus; NR: Núcleos del rafe; ATV: Área tegmental ventral

# EL NÚCLEO DEL RAFE DORSAL

## Localización

Los NR se caracterizan por ser el **origen de las fibras 5-HT**, donde se encuentran los somas de las neuronas que van a liberar este neurotransmisor en distintas partes del cerebro. Estas neuronas se encuentran agrupadas en 9 núcleos o *clusters* a lo largo de la línea media del tronco del encéfalo que han sido denominados en dirección caudal a rostral como **B1-B9**. En concreto, el **NRD** es el de mayor tamaño y representa los grupos **B6** (en la parte más caudal) y **B7** (en la parte rostral) y está situado en la parte ventral de la sustancia negra periacueductal, entre el acueducto mesencefálico y el fascículo longitudinal medial.

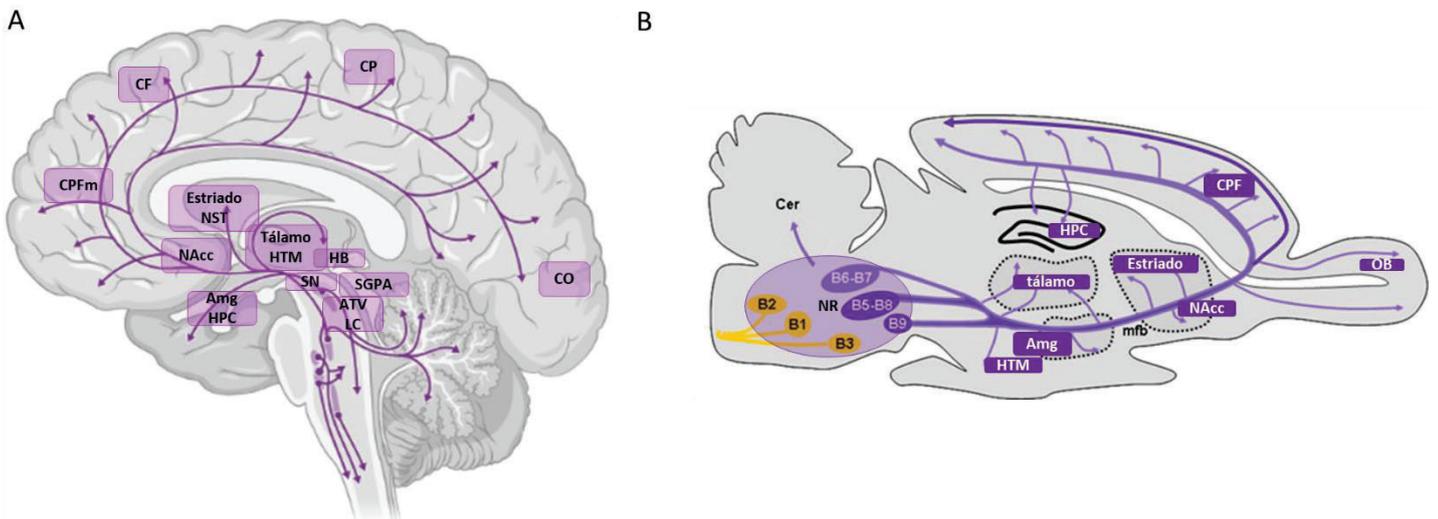
Así mismo, se distinguen **4 subdivisiones del NRD**: la parte más dorsal del NRD (**NRDd**), bajo esta se encuentra la zona ventral (**NRDv**), justo al lado de la primera se sitúa el NRD lateral (**NRDI**) y, por último, debajo del NRDI y justo al lado del NRDv encontramos la zona ventro lateral (**NRDvl**)



**Figura 12. Subdivisiones del núcleo del rafe dorsal (NRD).** Abreviaturas: NRDd: NRD dorsal; NRDdl: NRD dorso lateral; NRDv: NRD ventral; NRDvl: NRD ventro lateral. Modificado de Paxinos & Watson 2005

## Composición neuronal y conectividad del núcleo del rafe dorsal

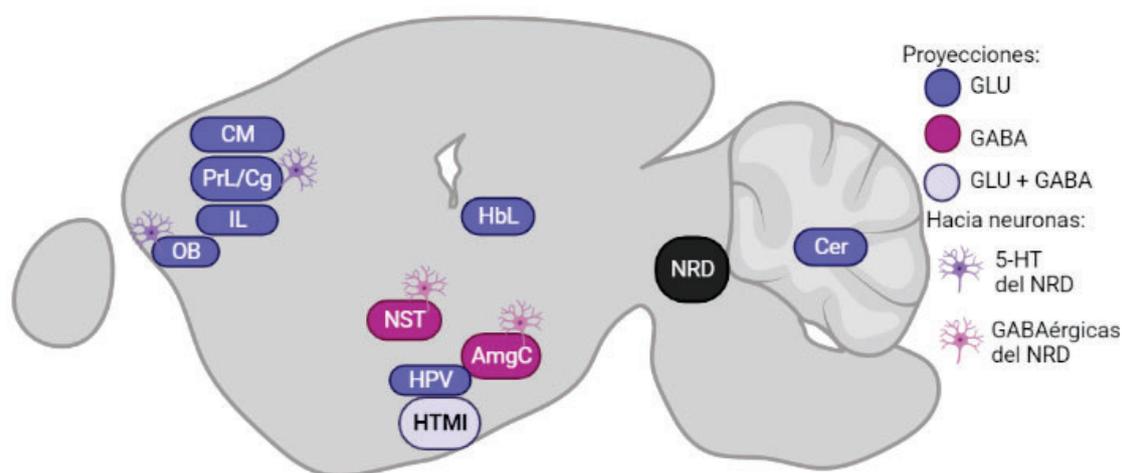
Los NR son pequeños grupos de neuronas que constituyen un mínimo porcentaje del total celular del cerebro, sin embargo, sus **densas proyecciones hacia todas las divisiones cerebrales (Figura 13)** hacen que influyan de manera integral en la actividad cerebral siendo de vital importancia en múltiples funciones como el ciclo sueño-vigilia, la respiración, la regulación emocional, la inhibición del dolor, la agresividad, etc.



**Figura 13. Proyecciones serotoninérgicas en cerebro humano (A) y cerebro de rata (B;** Modificada de Vitalis et al., 2013 ). Abreviaturas: CF: Córtex frontal; CP: Córtex parietal; CO: Córtex occipital; CPFm: Córtex prefrontal medial; NAcc: Núcleo accumbens; NST: Núcleo del lecho de la estría terminal; HTM: Hipotálamo; Amg: Amígdala; HPC: Hipocampo; SN: Sustancia nigra; HB: Habénula; SGPA: Sustancia gris periacueductal; ATV:

Área tegmental ventral; LC: Locus coeruleus; OB: Corteza orbital; NR: Núcleos del rafe; Cer: Cerebelo; mfb: *medial forebrain bundle* (haz medial del prosencéfalo).

Además, el NRD **recibe aferencias** de múltiples estructuras (**Figura 14**), siendo las más densas originarias de la parte **anterior del neocortex, la amígdala extendida y central, la habénula lateral, el hipotálamo, la sustancia nigra, ATV, núcleo cerebelar y médula espinal** (Weissbourd et al., 2014), sin embargo, tal y como se explicará a continuación, no todas las aferencias recibidas en el NRD afectan de la misma manera a toda la estructura, teniendo como objetivo preferente un tipo neuronal específico y localización dentro del núcleo.



**Figura 14. Aferencias recibidas por el núcleo del rafe dorsal (NRD).** Las cortezas motora (CM), prelímbica (PrL), cingulada (Cg), infralímbica (IL) y orbital (OB), junto con la habénula lateral (HbL), el núcleo paraventricular del hipotálamo (HPV) y el cerebelo (Cer) envían proyecciones glutamatérgicas al NRD. Por otro lado, la amígdala central (AmgC) y el núcleo del lecho de la estría terminal (NST) envían fibras GABAérgicas hacia el NRD. Desde el hipotálamo lateral (HTMI) se originan proyecciones tanto glutamatérgicas como GABAérgicas hacia el NRD. Las proyecciones derivadas de las áreas PrL/Cg y OB conectan preferentemente con neuronas serotoninérgicas (5-HT) del NRD frente a las GABAérgicas, sin embargo, aquellas proyecciones procedentes de la AmgC y el NST hacen sinapsis preferentemente con neuronas GABAérgicas del NRD.

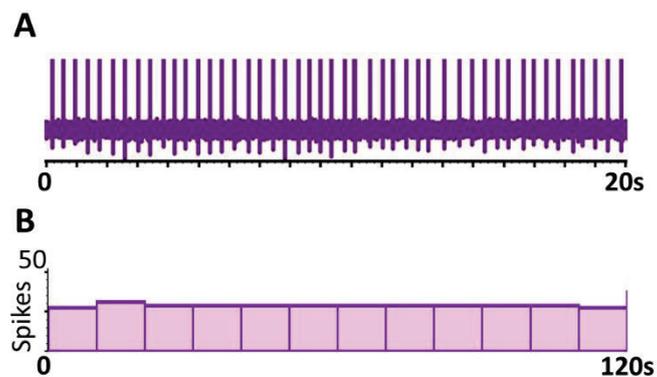
A pesar de que el NRD se consideró inicialmente como un núcleo estrictamente serotoninérgico, estudios posteriores han permitido identificar **diversos tipos neuronales**, como neuronas serotoninérgicas, glutamatérgicas, GABAérgicas, peptidérgicas, etc. En la presente tesis se pondrá el foco en los dos tipos neuronales que representan el mayor porcentaje de las neuronas del NRD: las neuronas 5-HT y las neuronas GABAérgicas.

## Neuronas serotoninérgicas del núcleo del rafe dorsal

Las **neuronas 5-HT suponen** aproximadamente **un 70%** de todas las células presentes en el NRD, representando alrededor de **un tercio de todas las neuronas 5-HT del cerebro** (Hornung, 2010). A pesar de ello, la composición celular de este núcleo es bastante heterogénea según nos muestran diversos estudios de los últimos años (Huang et al., 2019; Okaty et al., 2015, 2020; Ren et al., 2018).

Con respecto a su **morfología**, tanto en humanos como en rata, las neuronas 5-HT pueden ser **multipolares, ovoidales, triangulares y fusiformes** y su soma tiene un tamaño comprendido entre los **15 y 35  $\mu\text{m}$**  (Baker et al., 1990; Harandi et al., 1987; Li et al., 2001).

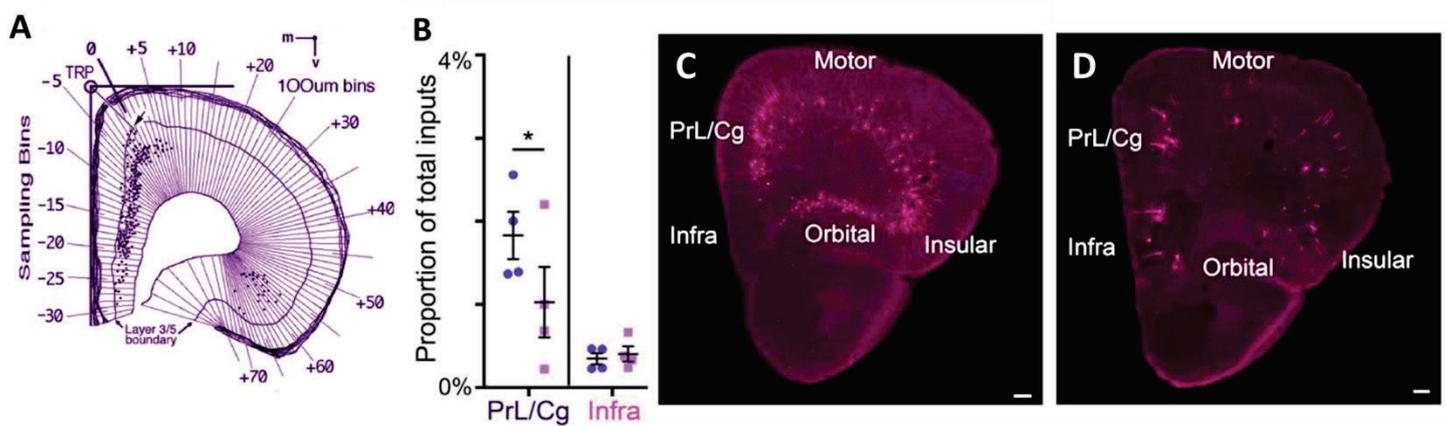
En referencia a sus **características electrofisiológicas**, las neuronas 5-HT presentan un patrón característico de **frecuencia de descarga lenta y regular** que suele oscilar entre los 0.2-3.5 spikes/s (**Figura 15**) (Beck et al., 2004; Celada et al., 2001; Crawford et al., 2010; Wang & Aghajani, 1977), un período post-hiperpolarización (afterhyperpolarization; **AHP**) **prolongado** ( $\approx 300$  ms; Beck et al., 2004; Crawford et al., 2010) y un potencial de acción (action potential; **AP**) **de unos  $\approx 2$  ms** de duración (Beck et al., 2004; Shikanai et al., 2012).



**Figura 15. Actividad regular de neurona serotoninérgica (5-HT) del núcleo del rafe dorsal (NRD).** A. Registro de neurona 5-HT, obtenido en nuestro laboratorio, con su característica descarga lenta y regular. B. Histograma (bins de 10s de duración) de la actividad de una neurona 5-HT del NRD durante 120s.

Con relación a su **conectividad**, una gran proporción de las aferencias recibidas por las neuronas 5-HT del NRD son derivados de la propia **conectividad local**, siendo el origen **otras neuronas 5-HT** (Weissbourd et al., 2014). Así mismo, reciben aferencias **glutamatérgicas** procedentes de **la corteza motora, orbital, insular** y la **CPFm**, donde parece que hay una

diferencia entre las distintas subdivisiones de esta área; mientras que la parte dorsal de la CPFm (**PrL y AC**) envían proyecciones con una **clara preferencia hacia las neuronas 5-HT** del NRD frente a las GABAérgicas, las fibras procedentes de la **corteza IL** de la CPFm **no muestran tal preferencia** en sus conexiones con el NRD (**Figura 16**) (Weissbourd et al., 2014). También recibe proyecciones **glutamatérgicas** de la **habénula lateral, el núcleo cerebelar, el hipotálamo lateral** (desde donde también reciben proyecciones de **orexina y GABAérgicas**) y el **núcleo hipotalámico paraventricular**, desde el cual también reciben inputs **peptidérgicos** (Morrison et al., 2012; Weissbourd et al., 2014).



**Figura 16. Proyecciones de la corteza prefrontal medial (CPFm) hacia el núcleo del rafe dorsal (NRD).** **A.** Neuronas de la CPFm de rata que proyectan hacia el NRD (Adaptada de Gabbott et al., 2005) **B.** Proporción de aferencias recibidas en el NRD desde las áreas prelímbica y cingulada (PrL y Cg, respectivamente) y desde el área infralímbica (Infra) en ratón. Neuronas 5-HT en círculos morados y neuronas GABAérgicas en cuadrados rosas. Nótese la preferencia de proyecciones dirigidas a neuronas 5-HT en las áreas PrL/Cg, mientras que el área IL proyecta ambos tipos neuronales de forma similar. **C.** Neuronas glutamatérgicas de la CPFm que proyectan a neuronas 5-HT del NRD. **D.** Neuronas glutamatérgicas de la CPFm que proyectan a neuronas GABAérgicas del NRD. B, C Y D modificadas de Weissbourd et al., 2014.

A nivel **neuroquímico**, muchas neuronas 5-HT **co-liberan otros neurotransmisores** como glutamato, GABA, DA, óxido nítrico y diversos péptidos (Fu et al., 2010). Así, varios autores distinguen entre diversos tipos de neuronas 5-HT, cada una con propiedades moleculares distintas y diferentes localizaciones dentro del propio NRD. Okaty y colaboradores llegan a describir hasta **14 tipos distintos de neuronas 5-HT** (Okaty et al., 2020), mientras que Huang y

colaboradores destacan sólo 5 tipos (Huang et al., 2019). En la presente tesis se describirán unas categorías más generales de la tipología de neuronas 5-HT (Commons, 2020) (**Figura 17B**).

Así, se describen 4 categorías de neuronas 5-HT en la parte **rostral del NRD**. Por un lado, se encuentran aquellas neuronas 5-HT que presentan **mayor número de marcadores de neurotransmisión GABA que de glutamato**, a estas, Commons las denomina “**neuronas 5-HT menos Vglut3**” y corresponden con los grupos 2, 3 y 4 de Okaty y colaboradores. Del mismo modo, están aquellas que presentan **más marcadores de neurotransmisión de glutamato que de GABA**, las cuales serían “**neuronas 5-HT más Vglut3**”, representando los grupos 9, 10 y 11 de Okaty. Por otra parte, hay un grupo de neuronas 5-HT que se encuentran a medio camino entre las primeras y las segundas a las que se les denomina “**transicionales**” (grupos 5 y 6 de Okaty), así como un último grupo de neuronas “**dispersas**” (Grupo 1 de Okaty), a las que se les ha dado tal nombre por no pertenecer a una subdivisión concreta del NRD, sino que son unas pocas neuronas que parecen estar “dispersas” por el núcleo.

Anatómicamente, cada uno de estos grupos presenta una localización característica. Las **neuronas 5-HT menos Vglut3** se sitúan **lateral, dorsal y rostralmente y proyectan mayoritariamente a áreas subcorticales** (Muzerelle et al., 2016). Las neuronas de la parte **lateral** conectan más con áreas relacionadas con lo **sensorial** mientras que la parte **rostral** del NRD proyecta preferentemente al **cerebro anterior límbico ventral** (Muzerelle et al., 2016).

Por el contrario, las **neuronas 5-HT más Vglut3** se sitúan **ventralmente en la zona medial a nivel rostro-caudal** y se consideran el origen fundamental de la **5-HT que llega a corteza** (Prouty et al., 2017; Ren et al., 2018).

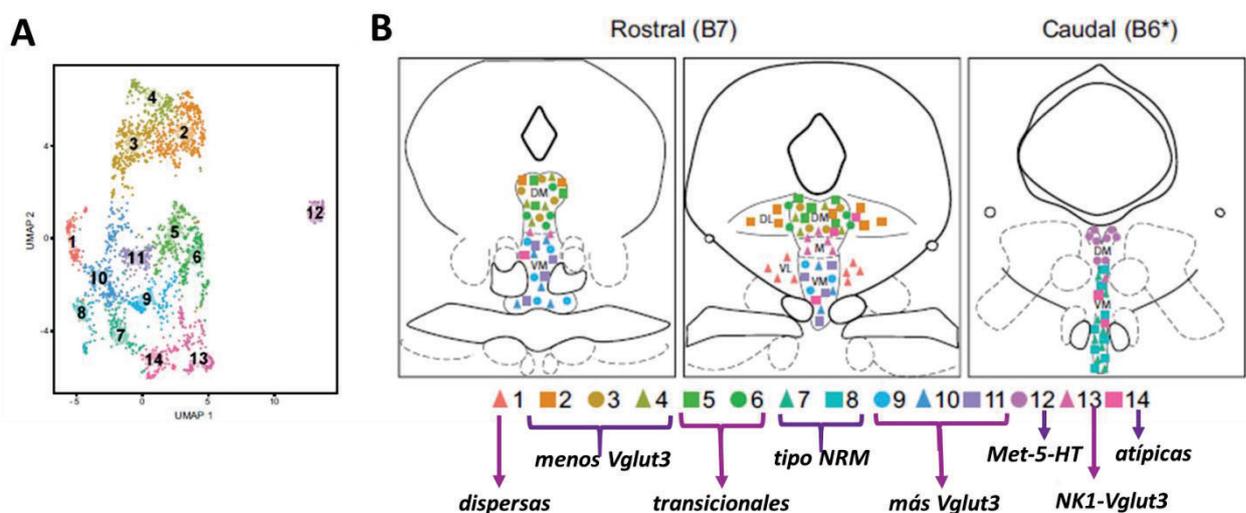
Por su parte, las neuronas **transicionales** comparten características de ambos tipos anteriores de neuronas y tienen una posición más **rostral** que caudal en el NRD (Okaty et al., 2020).

Poniendo el foco en la zona **caudal del NRD** también encontramos un grupo de neuronas con características muy similares a aquellas situadas en el núcleo del rafe medial (NRM) que Commons cataloga como “**neuronas tipo NRM**” y corresponderían a los grupos 7 y 8 de Okaty, de las cuales se especula que pueden contribuir a la liberación de 5-HT en el **sistema septohipocampal y estructuras corticales** (Commons, 2020). Justo en el polo caudal del NRD encontramos las neuronas 5-HT que expresan el receptor tirosina quinasa Met, denominadas “**neuronas Met-5-HT**”, que corresponden al grupo 12 de Okaty y colaboradores, las cuales son las

que presentan mayores diferencias con respecto a los otros grupos de neuronas 5-HT siendo estos bastante similares entre ellos (Okaty et al., 2020)( **Ver figura 17A**).

En la **zona medial del NRD**, justo entre las neuronas que se sitúan en la parte más dorsal y más ventral del NRD se localizan las neuronas 5-HT que expresan el receptor neurokinina 1 (NK1) (**neuronas NK1-Vglut3** o grupo 13 de Okaty) que parecen estar involucradas en el **procesamiento de la recompensa** (Qi et al., 2014). Esta zona del NRD **envía proyecciones glutamatérgicas al ATV** (Qi et al., 2014) y **recibe aferencias del núcleo tegmental rostromedial** (Sego et al., 2014). A su vez, parecen tener un papel específico **coordinando la actividad 5-HT** (Soiza-Reilly & Commons, 2011).

Por último, se puede distinguir un grupo neuronal que Commons cataloga como **“atípicas”**, correspondiente al grupo 14 de Okaty de las que actualmente no existe mucha información, salvo que son más parecidas a las *neuronas NK1-Vglut3* y que su **neurotransmisión serotoninérgica es variable y posiblemente baja**.



**Figura 17. Grupos de neuronas serotoninérgicas (5-HT) del núcleo del rafe dorsal (NRD).** **A.** Visualización UMAP (*Uniform Manifold Approximation and Projection*) de la similitud en la estructura transcriptómica de los diferentes grupos de neuronas 5-HT. Nótese la diferencia del grupo 12 (neuronas 5-HT que expresan el receptor tirosina quinasa Met (Met 5-HT)) con respecto a los demás. **B.** Localización de los distintos grupos de neuronas 5-HT en el NRD. Modificado de Okaty et al., 2020

## Neuronas GABAérgicas del núcleo del rafe dorsal

El segundo grupo celular más representativo en el NRD después de las neuronas 5-HT son las **neuronas GABAérgicas**, que comprenden sobre un **25%** del total celular de este núcleo (Johnson, 1994). Suelen ser de **menor tamaño** que las neuronas 5-HT (Harandi et al., 1987; Johnson, 1994; Li et al., 2001) y, en contraposición a estas que se localizan en grupos o *clusters*, las neuronas GABAérgicas se distribuyen ampliamente a lo largo del NRD.

A nivel **electrofisiológico**, presentan una **frecuencia de descarga más elevada** que las neuronas 5-HT (Allers & Sharp, 2003; Shikanai et al., 2012), un **AP de menor duración** ( $\approx 1\text{ms}$ ; Allers & Sharp, 2003), así como un **AHP también de menor duración que las neuronas 5-HT** (Hernández-Vázquez et al., 2019). Estas diferencias permiten distinguir entre ambos tipos neuronales.

Con respecto a su **localización en el NRD**, las neuronas GABAérgicas están situadas en una posición mucho más **caudal** que rostral y se observan mayoritariamente en las **alas laterales del NRD** (Bang & Commons, 2012a; Calizo et al., 2011).

En cuanto a su **conectividad**, las neuronas GABAérgicas del NRD reciben aferencias glutamatérgicas, GABAérgicas y peptidérgicas de múltiples áreas cerebrales. Por una parte, la principal fuente de **aferencias GABAérgicas** dirigidas a las interneuronas GABAérgicas del NRD provienen de la **amígdala central y la estría terminalis**, aunque también reciben fibras GABAérgicas desde el **hipotálamo lateral** (Weissbourd et al., 2014). Por otro lado, estas interneuronas **reciben aferencias glutamatérgicas de la corteza cerebral, el cerebelo y la habénula lateral**, así como del **hipotálamo** desde donde también reciben aferencias **peptidérgicas** (Weissbourd et al., 2014).

A pesar de que la mayoría de las neuronas GABAérgicas del NRD establecen conexiones locales con las neuronas próximas (neuronas 5-HT mayoritariamente), **algunas de ellas proyectan a estructuras cerebrales lejanas** al NRD como el **núcleo accumbens, el hipotálamo lateral y la CPF** (Bang & Commons, 2012a). Las neuronas GABAérgicas del NRD que proyectan a la **CPF** en concreto, se localizan en el **fascículo longitudinal medial**, en la parte media de la zona **rostral** del NRD, mientras que aquellas que realizan conexiones con el **hipotálamo lateral** se encuentran en partes más **caudales** del NRD (Bang & Commons, 2012a).

## Neurotransmisión en el núcleo del rafe dorsal

---

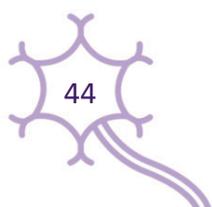
Antes del desarrollo de las técnicas más actuales como la fluorescencia inducida por formaldehído, que permiten una precisa caracterización neuroquímica, se consideraba al NRD un núcleo puramente serotoninérgico. Sin embargo, a lo largo de las últimas décadas se han observado **más de 10 tipos de neurotransmisores** en el NRD (Steinbusch et al., 2021) como **glutamato**, **GABA** (los cuales se han descrito anteriormente en el apartado 2.4 junto con sus receptores, que están también presentes en el NRD) y **óxido nítrico**, siendo neuronas 5-HT entre un 60-77% de las neuronas que lo expresan en el NRD (Wotherspoon et al., 1994).

Por otra parte, el NRD es rico en neuropéptidos como el **neuropéptido Y (NPY)** (de Quidt & Emson, 1986), **sustancia P** (Hökfelt et al., 1978), **galanina**, la cual es coexpresada con la 5-HT en un 40% aproximadamente de las neuronas del NRD (Sharkey et al., 2008), **encefalina** (enkephalin; **ENK**)(Glazer et al., 1981), el **factor de liberación de corticotropina** (corticotropin-releasing factor; **CRF**), siendo neuronas 5-HT el 96% de todas las que expresan CRF en el NRD (Commons et al., 2003) y la **orexina** (o hipocretina), la cual tiene un efecto excitador en las neuronas 5-HT (Ishibashi et al., 2016; Soffin et al., 2004; Wang et al., 2005) y su acción sobre ellas parece estar relacionada con el sueño REM y estados de cataplexia (Seifinejad et al., 2020).

Asimismo, diferentes monoaminas están presentes en el NRD, entre ellas la **DA**; las **neuronas 5-HT** del NRD presentan receptores de **D<sub>2</sub>** dopaminérgicos, los cuales son responsables del efecto excitador de la DA en las neuronas 5-HT del NRD (Ferré & Artigas, 2006). También podemos encontrar en el NRD **adrenalina**, **NA**, **histamina** y **acetilcolina**, aunque sin duda el principal neurotransmisor monoaminérgico en el NRD es la **5-HT**.

La 5-HT puede ser sintetizada en los intestinos o en los núcleos del rafe del cerebro. Aunque el 90% de la 5-HT de todo el organismo se encuentra fuera del SNC (células enterocromafines, plaquetas, endotelio pulmonar, etc.) esta no es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica por lo que toda la 5-HT existente en el **SNC** se sintetiza a través del **triptófano** y la **triptófano hidroxilasa** en los **NR**, desde donde se libera al resto del cerebro a través de los axones procedentes de las neuronas 5-HT y activa los distintos receptores de 5-HT.

Podemos distinguir **14 tipos distintos de 5-HT-R** agrupados en **7 familias (5-HT<sub>1-7-R</sub>)**; 13 de ellos son receptores metabotrópicos, unidos a distintos subtipos de proteína G (Ver Tabla 1). Tan **solo el**



**5-HT<sub>3</sub>-R** es **ionotrópico**, siendo el único receptor de este tipo de todos los receptores monoaminérgicos.

RECEPTOR	TIPO			FUNCIÓN		
	Metabotrópico			Ionotrópico	Inhibitorio	Excitatorio
	Proteína G <sub>i</sub> /G <sub>o</sub>	Proteína G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub>	Proteína G <sub>s</sub>			
5-HT <sub>1A</sub>	▲				▲	
5-HT <sub>1B</sub>	▲				▲	
5-HT <sub>1D</sub>	▲				▲	
5-HT <sub>1E</sub>	▲				▲	
5-HT <sub>1F</sub>	▲				▲	
5-HT <sub>2A</sub>		▲				▲
5-HT <sub>2B</sub>		▲				▲
5-HT <sub>2C</sub>		▲				▲
5-HT <sub>3</sub>				▲		▲
5-HT <sub>4</sub>			▲			▲
5-HT <sub>5A</sub>	▲				▲	
5-HT <sub>5B</sub>	▲				▲	
5-HT <sub>6</sub>			▲			▲
5-HT <sub>7</sub>			▲			▲

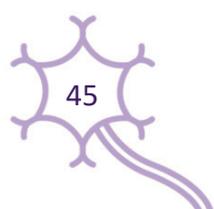
**Tabla 1. Receptores serotoninérgicos.** Tipos, acoplamiento a proteínas G y función

En el NRD las **neuronas 5-HT expresan una gran densidad de 5-HT<sub>1A</sub>-R**, acoplados a proteínas G<sub>i</sub>, que actúan como autoreceptores, inhibiendo la actividad neuronal de las propias neuronas 5-HT. Por otra parte, una menor proporción de neuronas 5-HT también expresan el **5-HT<sub>1D</sub>-R y 5-HT<sub>5B</sub>-R** y un mínimo porcentaje de estas neuronas contienen los **5-HT<sub>2C</sub>-R y 5-HT<sub>5A</sub>-R**.

Con respecto al receptor **5-HT<sub>2B</sub>-R**, se encuentran discrepancias según la especie en la que se estudie su expresión en el NRD; por un lado, estudios en **rata** muestran que el **5-HT<sub>2B</sub>-R** se localiza en **neuronas GABAérgicas**, a través de las cuales ejerce un control inhibitorio indirecto de las neuronas 5-HT que inervan la CPFm (Cathala et al., 2019), sin embargo, los estudios en **ratón** localizan el **5-HT<sub>2B</sub>-R** en **neuronas 5-HT** del NRD (Diaz et al., 2012), donde ejercen directamente un control positivo en la actividad de las neuronas 5-HT (Belmer et al., 2018; Launay et al., 2006).

Por otra parte, **tanto las neuronas GABAérgicas como las neuronas glutamatérgicas del NRD** expresan ampliamente el **5-HT<sub>2C</sub>-R**, acoplado a proteínas G<sub>q</sub>, aunque también muestran expresión en menor medida de los **5-HT<sub>1A</sub>-R, 5-HT<sub>1B</sub>-R, 5-HT<sub>5A</sub>-R y 5-HT<sub>7</sub>-R** (Huang et al., 2019).

Asimismo, las **neuronas peptidérgicas** del NRD muestran expresión del **5-HT<sub>2C</sub>-R, 5-HT<sub>5B</sub>-R** y, muy ligeramente, del **5-HT<sub>1B</sub>-R** (Huang et al., 2019).



Por último, los **macrófagos** en el NRD se caracterizan por la expresión del **5-HT<sub>1B</sub>-R** y las **células ependimarias** presentan expresión del **5-HT<sub>5B</sub>-R** (Huang et al., 2019).

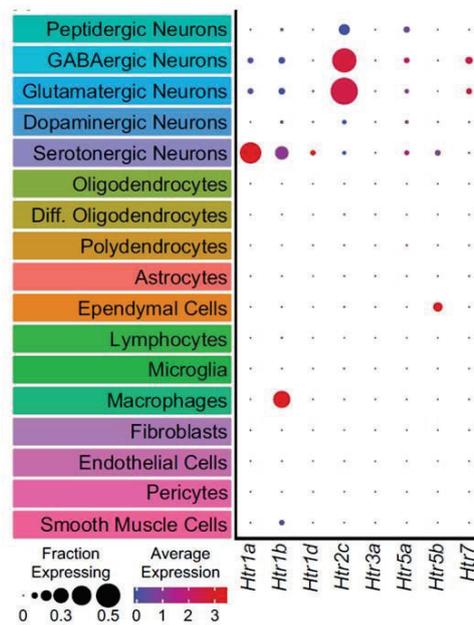


Figura 18. Expresión de receptores serotoninérgicos en los distintos tipos celulares del núcleo dorsal del rafe. (Huang et al., 2019)

## CONECTIVIDAD ENTRE LA CPFm Y EL NRD

Al igual que otras áreas corticales, la CPF recibe densas aferencias 5-HT procedentes principalmente del NRD (McQuade & Sharp, 1997). Sin embargo, a diferencia del resto de estructuras corticales, la CPF también envía una gran cantidad de fibras descendentes directamente hacia el NRD, formadas por los axones de las neuronas piramidales de capa V (Gabbott et al., 2005; Gonçalves et al., 2009; Hoover & Vertes, 2007; Vertes, 2004; Weissbourd et al., 2014). Al igual que con otras estructuras corticales y subcorticales, la CPF ejerce un **control jerárquico (top-down)** sobre la actividad del NRD, tal y como se ha mencionado en el apartado 2.5.

En razón de esta conectividad recíproca, la **CPFm presenta una alta expresión de 5-HT-R**, especialmente de los **5-HT<sub>1A</sub>-R** (función inhibitoria) y **5-HT<sub>2A</sub>-R** (función excitatoria) presentes tanto

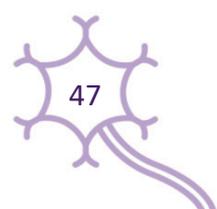
en neuronas piramidales como en neuronas GABAérgicas (Santana et al., 2004). Curiosamente, se ha observado una coexpresión de  $\approx 80\%$  de ambos 5-HT-R en la mayoría de las subdivisiones de la CPF (Amargós-Bosch et al., 2004), por lo que la 5-HT podría inhibir las neuronas de la CPF a través del 5-HT<sub>1A</sub>-R y también provocar el efecto opuesto estimulando las neuronas de la CPF mediante el 5-HT<sub>2A</sub>-R. De esta manera, diversos estudios funcionales demuestran mediante observaciones electrofisiológicas *in vivo*, que la **5-HT endógena puede modificar la actividad de neuronas de la CPFm a través de estos receptores** (Puig et al., 2003, 2005) así como **modular la actividad oscilatoria de la CPF** (Celada et al., 2013; Puig & Gullledge, 2011).

Por otra parte, los 5-HT<sub>3</sub>-R de carácter ionotrópico, están expresados por un alto porcentaje de **interneuronas GABA de capas superiores de la CPF (I-III)** que controlan las entradas excitatorias -posiblemente de origen talámico- a los penachos de las dendritas apicales de neuronas piramidales de capas profundas (Puig et al., 2004). La activación de dichos receptores tras la estimulación del NRD induce un marcado aumento de actividad de las interneuronas GABAérgicas que los expresan (Puig et al., 2004). En cambio, su bloqueo mediante antagonistas aumenta la frecuencia de descarga de las neuronas piramidales de capa V que proyectan al mesencéfalo (NRD y ATV) (Riga et al., 2017).

Otros 5-HT-R, como **el 5-HT<sub>4</sub>-R y el 5-HT<sub>7</sub>-R** también se expresan en la CPF, aunque en menor densidad que los mencionados anteriormente. La sobre-expresión de 5-HT<sub>4</sub>-R mediante vectores virales ejerce un feed-back positivo sobre la actividad del NRD (Lucas et al., 2005) y se han propuesto agonistas 5-HT<sub>4</sub>-R como antidepresivos de acción rápida en roedores (Lucas et al., 2007), aunque nunca se han llegado a desarrollar para su uso humano.

Los estudios mencionados anteriormente no han hecho distinción entre las diferentes subdivisiones de la CPFm. A este respecto, es destacable la diferencia que presenta la zona IL de la CPFm en comparación con zonas más dorsales (PrL y Cg) en cuanto a la cantidad de 5-HT<sub>2A</sub>-R expresado, siendo esta bastante menor en IL que en PrL. Así pues, **la proporción 5-HT<sub>1A</sub>-R/5-HT<sub>2A</sub>-R en PrL es de 1,2 mientras que en IL es de 3,33** (Santana & Artigas, 2017b) (**Ver figura 10A2 y A3**), datos que sugieren que la **5-HT puede tener una mayor acción inhibitoria en IL que en PrL**.

De la misma manera, estudios electrofisiológicos también demuestran el control que ejerce la CPFm sobre las neuronas 5-HT del NRD produciendo principalmente una respuesta inhibitoria en esta estructura (Hajós et al., Neuroscience 1998; Celada et al., 2001; Srejjic et al., 2015, 2016). En relación



con ello, se han visto **diferencias entre ambas áreas de la CPFm (PrL e IL)** en su relación con el NRD. Por una parte, se ha observado un **aumento en la liberación de serotonina en IL de rata** al incrementar de manera aguda la neurotransmisión mediada por el receptor AMPA **a través de su activación directa mediante S-AMPA** y del **bloqueo del transportador de glutamato astroglial GLT-1**, lo que a su vez da lugar a un efecto antidepresivo (Gasull-Camós et al., 2017). Sorprendentemente, **no se vio ningún efecto -neuroquímico o comportamental-** cuando la activación pro S-AMPA o el **bloqueo de GLT-1 se realizaron en PrL.**

Contrariamente, un **aumento sostenido de la actividad glutamatérgica en la corteza IL utilizando ratones knock-down** para la expresión de los transportadores de glutamato astrogliales GLAST y GLT-1 mediante ARN de interferencia (small interfering RNA; siRNA) (Fullana et al., 2019a) induce **un fenotipo depresivo**, revertido por citalopram y KET (Fullana et al., 2019b). Este fenotipo comportamental iba acompañado de una **función 5-HT disminuida** y una reducción en la expresión de BDNF hipocampal. De nuevo, la **misma acción en PrL tiene consecuencias diferentes** puesto que la aplicación del siRNA en PrL, a pesar de reducir la expresión de GLAST y GLT-1 como en IL, **no indujo el fenotipo depresivo ni redujo la función 5-HT** (Fullana et al., 2019b).

En conclusión, la evidencia nos indica la existencia de marcadas diferencias entre la parte dorsal y ventral de la CPFm en lo referente a su control sobre el NRD y también aporta indicios de que esta estructura límbica (NRD) ejerce una acción diferencial en PrL y en IL, sin embargo, pese a los indicativos existentes, sigue siendo de **vital importancia el estudio en profundidad de esta conectividad CPFm-NRD y viceversa para tener una visión más detallada de su funcionamiento y así poder contribuir a la mejora de tratamientos antidepresivos**, dada la gran importancia de este circuito en el TDM.

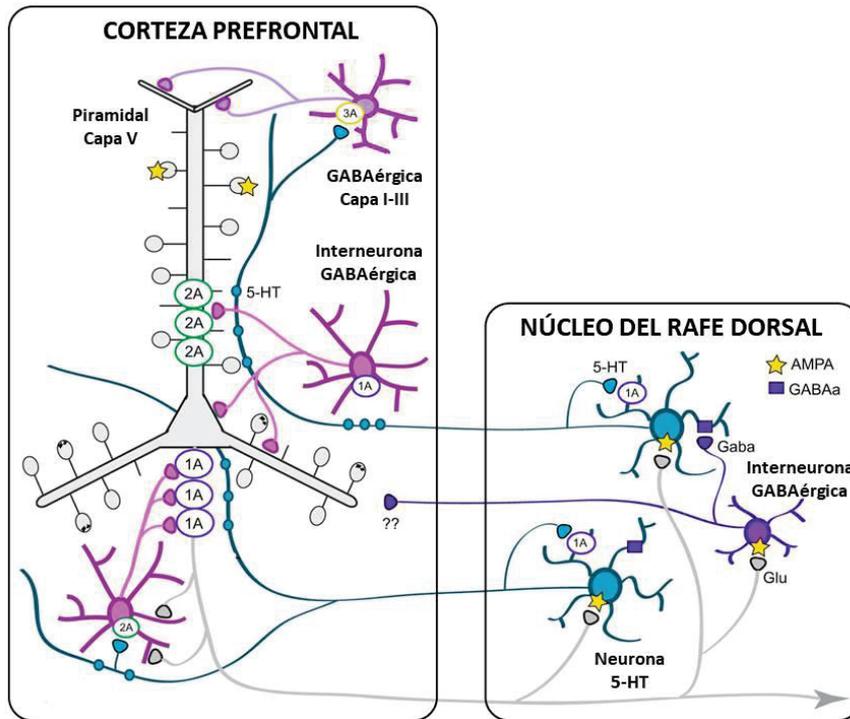


Figura 19. Representación esquemática de la relación entre la corteza prefrontal medial y el núcleo del rafe dorsal incluyendo los receptores más influyentes. Adaptada de Celada et al., 2013.



# **Hipótesis y objetivos**



## HIPÓTESIS

---

La presente tesis ha sido realizada bajo la hipótesis de que la **estimulación del NRD puede modular la actividad de las neuronas piramidales de las cortezas PrL e IL de manera diferencial** debido a la distinta expresión de receptores inhibitorios (5-HT<sub>1A</sub>-R) y excitatorios (5-HT<sub>2A</sub>-R) en ambas áreas.

Asimismo, dada la diferente contribución de PrL e IL en el comportamiento depresivo en roedores, y a pesar de la existencia de proyecciones directas al NRD en ambas subdivisiones de la CPFm, **PrL e IL pueden ejercer un control diferente sobre la actividad de las neuronas 5-HT**, posiblemente debido a diferencias en las neuronas diana de estas proyecciones (neuronas 5-HT y neuronas GABAérgicas dentro del NRD).

### OBJETIVO 1

Estudiar las **respuestas de las neuronas piramidales de capa V en las cortezas PrL e IL a la estimulación eléctrica del NRD** a una frecuencia fisiológica (0.9Hz), así como identificar los mecanismos involucrados en las respuestas originadas en cada área.

### OBJETIVO 2

Estudiar los **efectos de la estimulación eléctrica y optogenética de las cortezas PrL e IL sobre la actividad de neuronas 5-HT del NRD y en la liberación de 5-HT en el NRD**, no solo a baja frecuencia (0.9 Hz), sino también a frecuencias más altas (10 Hz y 20 Hz), representativas de la actividad fásica de la CPFm, así como **caracterizar las posibles diferencias rata-ratón del control GABAérgico en el NRD**.



# Resultados



---

# Trabajo 1

---

## **Preferential in vivo inhibitory action of serotonin in rat infralimbic vs. prelimbic cortex: Relevance for antidepressant treatments**

Elena López-Terrones <sup>1,3</sup>, Pau Celada <sup>1,2,3</sup>, Maurizio S. Riga <sup>1,2,3,4</sup>, and Francesc Artigas <sup>1,2,3</sup>

*Cerebral Cortex* (2022) Jul 12;32(14):3000-3013

doi: 10.1093/cercor/bhab396.

1. Depart. de Neurociències i Terapèutica Experimental, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, IIBB-CSIC; Barcelona, Spain
2. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain
3. Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain
4. Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER-CSIC), Sevilla, Spain



# Preferential *in vivo* inhibitory action of serotonin in rat infralimbic versus prelimbic cortex: relevance for antidepressant treatments

Elena López-Terrones<sup>1,3</sup>, Pau Celada<sup>1,2,3</sup>, Maurizio S. Riga<sup>1,2,3,4,\*†</sup>, Francesc Artigas<sup>1,2,3,\*†</sup>

<sup>1</sup>Depart. de Neurociències i Terapèutica Experimental, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, IIBB-CSIC, 08036 Barcelona, Spain,

<sup>2</sup>Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), 08036 Barcelona, Spain,

<sup>3</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain,

<sup>4</sup>Current address: Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER-CSIC), 41092 Sevilla, Spain

\*Corresponding authors: Maurizio S. Riga, Depart. de Teràpia Celular y Regeneración, Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER-CSIC), Av. Americo Vespucio, s/n, Sevilla 41092, Spain. Email: mauriga@gmail.com, or Francesc Artigas, Departament de Neurociències i Terapèutica Experimental, IIBB-CSIC, IDIBAPS, CIBERSAM, C/Rosselló 161, 6th floor, Barcelona 08036, Spain. Email: francesc.artigas@iibb.csic.es

†Maurizio S. Riga and Francesc Artigas have contributed equally to this work

The infralimbic (IL) cortex is the rodent equivalent of human ventral anterior cingulate cortex (vACC), which plays a key role in the pathophysiology and treatment of major depressive disorder (MDD). The modulation of glutamatergic neurotransmission in IL [but not in the adjacent prelimbic (PrL) cortex] evokes antidepressant-like or depressive-like behaviors, associated with changes in serotonin (5-HT) function, highlighting the relevance of glutamate/serotonin interactions in IL for emotional control. 5-HT modulates neuronal activity in PrL and cingulate (Cg) cortex but its effects in IL are largely unknown. We therefore compared the *in vivo* effects of 5-HT on pyramidal neuron activity in IL ( $n = 61$ ) and PrL ( $n = 50$ ) of anesthetized rats. IL pyramidal neurons were more responsive to physiological dorsal raphe stimulation (0.9 Hz) than PrL neurons (84% vs. 64%, respectively) and were inhibited to a greater extent (64% vs. 36%, respectively). Orthodromic activations (8% in PrL) were absent in IL, whereas biphasic responses were similar (20%) in both areas. Excitations were mediated by 5-HT<sub>2A</sub>-R activation, whereas inhibitions involved 3 different components: 5-HT<sub>1A</sub>-R, 5-HT<sub>3</sub>-R and GABA<sub>A</sub>-R, respectively. The remarkable inhibitory action of 5-HT in IL suggests that 5-HT-enhancing drugs may exert their antidepressant action by normalizing a glutamatergic hyperactivity in the vACC of MDD patients.

**Key words:** 5-hydroxytryptamine (serotonin); 5-hydroxytryptamine receptors; infralimbic cortex; major depressive disorder; pyramidal neurons.

## Introduction

The prefrontal cortex (PFC) is deeply involved in higher brain functions, many of which are altered in psychiatric conditions. Lateral areas, particularly the dorsolateral PFC (e.g., Brodmann area 46), play a central role in cognitive processes, whereas orbital and ventromedial regions are engaged—but not only—in emotional and behavioral control. In particular, the ventral anterior Cg cortex, vACC, (also referred to as ventromedial PFC, subgenual or subcallosal anterior Cg cortex) plays a key role in emotional regulation (Groenewegen and Uylings 2000; Miller and Cohen 2001; Fuster 2008; Roy et al. 2012; Delgado et al. 2016; Hiser and Koenigs 2018; Alexander et al. 2019; Andrewes and Jenkins 2019). The vACC and particularly Brodmann area 25, Cg25, is a key cortical area in the pathophysiology of mood and anxiety disorders (Burgos-Robles et al. 2007; Milad et al. 2007; Koenigs and Grafman 2009; Peters et al. 2010; Myers-Schulz and Koenigs 2012; Alexander et al. 2019) due to—among

others—its connectivity and top-down control of limbic (e.g., amygdala) hypothalamic and reward-linked structures, such as the ventral striatum and the ventral tegmental area (Groenewegen and Uylings 2000; Maren and Quirk 2004; Blair 2007; Sierra-Mercado et al. 2011; Hiser and Koenigs 2018; Andrewes and Jenkins 2019; Lingawi et al. 2019).

There is a growing interest in the vACC as a regional target for antidepressant action due to its hyperactivity in treatment-resistant patients with major depressive disorder (MDD) (Seminowicz et al. 2004; Mayberg et al. 2005; Drevets et al. 2008), and the observation that deep brain stimulation (DBS) of Cg25 evokes an immediate clinical improvement (Mayberg et al. 2005; Puigdemont et al. 2012). However, a large multicentric trial did not find statistical differences between treatment and control groups (Holtzheimer et al. 2017). More recently, a functional magnetic resonance imaging study revealed a higher task-based activation of vACC in MDD patients

Received: June 10, 2021. Revised: September 29, 2021. Accepted: September 30, 2021.

© The Author(s) 2021. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

versus controls, an alteration that normalized after treatment with the fast-acting antidepressant drug ketamine (Morris et al. 2020).

In the rat, the PFC contains 4 main regions, medial, lateral, ventral, and orbital, each containing several subdivisions that may vary according to different authors (Uylings et al. 2003; Dalley et al. 2004; Swanson 2004; Paxinos and Watson 2005; Fuster 2008; Herculano-Houzel et al. 2013). The medial PFC (mPFC) is a key cortical area in psychiatric research: its function is altered in animal models of mental disorders, and it contains the monoamine receptors and transporters targeted by antidepressant and antipsychotic drugs. The Cg, prelimbic (PrL), and infralimbic (IL) subdivisions of mPFC play distinct roles in the processing of cognitive, emotional, and behavioral information. In particular, the IL cortex is considered as the rodent equivalent of the primate and human vACC, particularly Brodmann area 25, in terms of connectivity and function (Heilbronner et al. 2016; Alexander et al. 2019). Hence, both the primate/human vACC and the rodent IL play an essential role in fear extinction (Milad and Quirk 2002; Milad et al. 2005, 2007; Izquierdo et al. 2006; Burgos-Robles et al. 2007; Nieuwenhuis and Takashima 2011; Lingawi et al. 2019).

The rodent IL is also involved in antidepressant-like actions. The optogenetic stimulation of IL induced immediate and long-lasting antidepressant effects in rats, similar to those evoked by ketamine (Fuchikami et al. 2015). Further, the local application of the selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) citalopram or ketamine in rat IL mimicked the effects of their systemic administration (Fuchikami et al. 2015; Gasull-Camós et al. 2018). Moreover, an acute increase of  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor (AMPA-R)-mediated neurotransmission in rat IL induced by the transient blockade of the glial glutamate transporter GLT-1 induced robust antidepressant-like effects and markedly enhanced 5-HT release in IL (Gasull-Camós et al. 2017). Remarkably, neither effect occurred after GLT-1 blockade in PrL (Gasull-Camós et al. 2017).

Conversely, a sustained glutamatergic hyperactivity in mouse IL after knocking down the expression of the astroglial glutamate transporters Glutamate-Aspartate Transporter (GLAST) and Glutamate Transporter-1 (GLT-1) with small interfering RNA (siRNA) (Fullana et al. 2019) induced a robust depressive-like phenotype, reversed by citalopram and ketamine (Fullana et al. 2019). This behavioral phenotype was accompanied by a reduced serotonergic function and reduced hippocampal BDNF expression. Remarkably, siRNA application in PrL reduced GLAST and GLT-1 expression as in IL, but did not induce a depressive-like phenotype nor reduced 5-HT function (Fullana et al. 2019).

Overall, these observations support a key role of the glutamate/5-HT interplay in IL (but not PrL) in emotional regulation. Given the involvement of 5-HT in MDD

pathophysiology and treatment, and its control of neuronal activity in PFC (Puig et al. 2005, Celada et al. 2013), we conducted the present study in rats, to gain insight on the control of pyramidal neuron activity in IL, also examining regional differences (IL vs. PrL) that may partly account for the preferential role of IL in depressive-like behaviors and in antidepressant treatment.

## Materials and methods

### Animals

Male albino Wistar rats weighting 250–300 g were used (Charles River, France). They were kept in a controlled environment (12 h light: 12 h dark cycle and  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  room temperature), with food and water provided ad libitum. The experiments were conducted in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Animals (Scientific Procedure) Act 1986 and following the ARRIVE guideline (Kilkenny et al. 2010) during the awake phase. Animal care followed European Union regulations (directive 2010/63 of 22 September 2010) and was approved by the Institutional Animal Care and Use Committees. Stereotaxic coordinates (in mm) were taken from bregma and dura mater according to the rat atlas of Paxinos and Watson (2005).

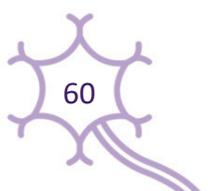
### Drugs

WAY-100635 maleate (5-HT<sub>1A</sub>-R antagonist), ondansetron (OND; 5-HT<sub>3</sub>-R antagonist), picrotoxinin (PIC; gamma-amino butyric acid (A) receptor (GABA<sub>A</sub>-R) antagonist), and M100907 (5-HT<sub>2A</sub>-R antagonist) were from Sigma/RBI (Natick, MA). The SSRI citalopram hydrobromide was from Tocris. Doses are expressed as free bases. WAY-100635 maleate and ondansetron were dissolved in saline. M100907 was dissolved in saline containing a drop of acetic acid, and the solution was brought to pH 7.0 with sodium bicarbonate. WAY-100635, ondansetron, and M100907 were stored at  $-20^\circ\text{C}$  until use. Picrotoxinin was dissolved in 10% DMSO and prepared on the day of experiments. Drugs were injected intravenously (i.v.) at the volume of 1 mL/kg.

### Electrophysiology

Single unit extracellular recordings of mPFC pyramidal neurons were performed with a glass micropipette filled by Pontamine Sky Blue as described in previous studies from the group (Puig et al. 2005; Kargieman et al. 2007; Riga et al. 2016). Rats were anesthetized with intraperitoneal administration of chloral hydrate (induction: 400 mg/kg; maintenance: 50–70 mg/kg/h using a perfusion pump) and fixed in a David Kopf stereotaxic frame. Body temperature was maintained at  $37^\circ\text{C}$  throughout the experiment with a heating pad.

Two stimulation bipolar electrodes were stereotaxically implanted in dorsal raphe (DR; AP:  $-7.8$ , L:  $-3.1$  with a lateral angle of  $30^\circ$ , DV:  $-6.5$ ) and ventral tegmental area (VTA; AP:  $-5.8$ , L:  $-0.4$  DV:  $-8$ ) (coordinates in mm, taken from bregma and durameter;



Paxinos and Watson 2005). Layer V pyramidal neurons from PrL and IL were identified by antidromic stimulation from both projection areas (DR and/or VTA) followed by the collision test (Fuller and Schlag 1976). Both stimulation sites identify a population of layer V pyramidal neurons projecting to midbrain (Gabbott et al. 2005), with a large percentage of neurons (50–60%) projecting to both monoaminergic nuclei, as assessed by track-tracing and electrophysiological methods (Vázquez-Borsetti et al. 2009, 2011). DR and VTA were stimulated at 0.5–2.0 mA, 0.2 ms square pulses, 0.9 Hz, as previously reported (Puig et al. 2005; Kargieman et al. 2007). The mean intensity value used in PrL and IL recordings was not statistically different (PrL:  $1.04 \pm 0.06$  mA,  $n = 50$ ; IL:  $1.13 \pm 0.06$  mA,  $n = 61$ ; n.s. Student's *t*-test). Neurons not responding to antidromic activation or without spontaneous firing activity were not considered.

Descents in mPFC were carried out at AP +3.4 to +3.2, L: –0.5 to –1.0. DV coordinates of all recorded neurons were used to identify their location in PrL (DV: –1.2 to –3) and IL (DV: –3.2 to –4.5) subdivisions of the mPFC. To avoid systemically recording IL neurons after PrL neurons along DV descents, recordings were randomly started in PrL or IL to further proceed with the other subdivision. Once a spontaneously active pyramidal neuron was identified, its discharge was recorded for at least 5 min (basal activity). Then, the DR was stimulated for 5 min in order to record the response of the recorded neuron to endogenous 5-HT. Once the recording was completed, the glass electrode was descended until a new spontaneously active neuron was detected and recorded, as described. Typically, 1–3 tracks at different AP coordinates were performed during a 4–5 h recording session.

#### Pharmacological characterization of DR-induced responses in pyramidal neurons

We performed a pharmacological characterization of inhibitory and excitatory responses induced by DR stimulation in groups of PrL and IL layer V pyramidal neurons. The neurons recorded in these experiments were not used to calculate the proportions of neuronal response (i.e., excitations, inhibitions or biphasic responses) evoked by DR stimulation. The involvement of 5-HT<sub>1A</sub>-R in DR-mediated inhibitory responses was characterized using the selective 5-HT<sub>1A</sub>-R antagonist WAY-100635. After recording inhibitory effects of DR stimulation on pyramidal neuron activity during 5 min, WAY-100635 (100  $\mu$ g/kg i.v.) was administered and the recording was kept for at least 10 more min. We also examined the potential contribution of 2 additional components to DR-mediated inhibitions, mediated by 5-HT<sub>3</sub>-R and GABA<sub>A</sub>-R activation. The involvement of 5-HT<sub>3</sub>-R was suggested by their selective expression by GABA interneurons in upper layers of mPFC, which were markedly activated by DR stimulation (Puig et al. 2004), and by the enhancement of pyramidal neuron activity induced after 5-HT<sub>3</sub>-R blockade (Riga et al. 2016). Reversal of this putative component of inhibitions

was attempted with the selective 5-HT<sub>3</sub>-R antagonist ondansetron (OND, 1.28 mg/kg i.v.). On the other hand, the presence of a short-latency component of inhibitions (often preceding the antidromic potential; see below) involving a direct DR-mPFC GABA pathway (Puig et al. 2005; Bang and Commons 2012) was characterized using the GABA<sub>A</sub>-R antagonist picrotoxinin (PIC, 2.5 mg/kg i.v.). In both cases, experiments were conducted as for WAY-100635.

On the other hand, the involvement of 5-HT<sub>2A</sub>-R in orthodromic activations or biphasic responses was assessed using the 5-HT<sub>2A</sub>-R antagonist M100907. After recording pure orthodromic excitations or biphasic responses during 5 min, M100907 (300  $\mu$ g/kg i.v.) was administered, and the recording was kept for at least more 10 min. The effect of the SSRI citalopram on the magnitude of DR-evoked inhibitions was examined in pilot experiments.

After completion of experimental procedures, rats were euthanized by an anesthetic overdose. Brains were removed, frozen on dry ice and kept at –80°C before being cut into coronal sections (50  $\mu$ m) with a cryostat in order to verify the recording and stimulation sites using Neutral Red staining.

#### Data and statistical analysis

The responses in mPFC pyramidal neurons evoked by DR stimulation were characterized by measuring the magnitude and duration of inhibitory and excitatory responses from peristimulus-time histograms (PSTH) (4 ms width) as previously described (Puig et al. 2005). One-ms bins were also used to calculate the latencies of GABA<sub>A</sub>-R-mediated inhibitory responses with better precision. Antidromic spikes had a fixed latency and were produced by the electrical stimulation of axons of mPFC pyramidal neurons projecting to the DR and/or VTA (Celada et al. 2001; Gabbott et al. 2005; Puig et al. 2005). Orthodromic activations consisted of spikes with short and variable latencies and a poststimulus firing rate greater than the mean prestimulus firing rate plus 2 times the standard deviation during at least 4 bins (Hajós et al. 1998; Puig et al. 2005). The success rate in orthodromic activations was calculated as the number of spikes during the excitation period divided by the number of triggers. Inhibitions were defined by a total cessation of spikes with respect to the prestimulus value for at least 4 successive bins (10 msec width) or a 75% decrease in the number of spikes with respect to the prestimulus (Hajós et al. 1998; Puig et al. 2005). The onset of inhibitions was calculated as the last bin containing a spike, whereas the offset of excitations was identified as the first of 4 bins equal to or above the prestimulus value. The magnitude of the inhibition was calculated as the percentage of firing versus the prestimulus (200 ms) firing rate. Drug effects were calculated by comparing 5-min PSTHs at pre- and postdrug periods. Data are expressed as the mean  $\pm$  standard error of mean. Statistical analysis was carried out using GraphPad Prism

6 by independent and paired Student's *t*-tests. Statistical significance has been set at the 95% confidence level (2 tailed).

## Results

### Characteristic of the recorded mPFC pyramidal neurons

A total of 111 pyramidal neurons from 35 rats were randomly found and recorded along descents in PrL and IL. Additionally, neurons excited or inhibited by DR stimulation were intentionally searched for and used to examine the receptor mechanisms involved (see below). The data from these neurons ( $n = 36$ ) were not used in the present calculations.

Figure 1A shows the areas where pyramidal neurons were recorded in PrL ( $n = 50$ ) or IL ( $n = 61$ ). The recorded units are representative of layer V pyramidal neuron populations projecting to DR, VTA or both. Thirty-two (29%) projected only to DR, 27 (24%) only to VTA and 52 (47%) projected to both nuclei. The latter proportion is in agreement with previous observations from our laboratory (Vázquez-Borsetti et al. 2011). The basal firing rate was  $1.1 \pm 0.1$  spikes/s ( $n = 111$ ). The latency of the antidromic spikes evoked by DR stimulation was  $13 \pm 1$  ms ( $n = 84$ ), also in agreement with previous observations (Puig et al. 2005; Vázquez-Borsetti et al. 2011). No significant differences in the basal firing rate were observed between PrL neurons ( $1.1 \pm 0.1$  spikes/s;  $n = 50$ ) and IL neurons ( $1.2 \pm 0.2$  spikes/s;  $n = 61$ ) ( $P = 0.87$ , Student's *t*-test) nor in the latency of the antidromic spikes evoked by DR stimulation (PrL =  $13 \pm 1$  ms;  $n = 33$ ; IL =  $13 \pm 1$  ms;  $n = 51$ ,  $P = 0.89$ , Student's *t*-test). Significant differences were found in the proportion of PrL and IL neurons projecting only to DR or VTA, but not in the proportion of neurons coprojecting to both sites. Hence, 8/50 neurons in PrL projected only to DR (16%), 17/50 projected to VTA (34%) and 25/50 projected to both sites (50%). On the other hand, 24/61 neurons in IL projected to DR (40%), 10/61 to VTA (16%) and 27/61 to both sites (44%) ( $P < 0.05$ , chi-square test) (Fig. 1B).

### Modulation of pyramidal neuron activity in mPFC by DR stimulation

We examined the effect of the stimulation of the DR on mPFC pyramidal neuron activity in 111 recordings. A large proportion of neurons (83/111, a 75%) were sensitive to the DR stimulation at a physiological rate (0.9 Hz), which evoked pure inhibitory responses (I) in 57/111 cases (51%), biphasic responses (BR i.e., an orthodromic excitation preceded by an inhibition of short latency and duration) in 22/111 cases (20%) and only 4/111 cases (4%) were pure orthodromic excitations (OA). The rest (28/111, a 25%) were unresponsive (UN) by DR stimulation. Table 1 shows the characteristics of each response considering the mPFC as a whole.

### Differential responses evoked by DR stimulation in pyramidal neurons of IL and PrL

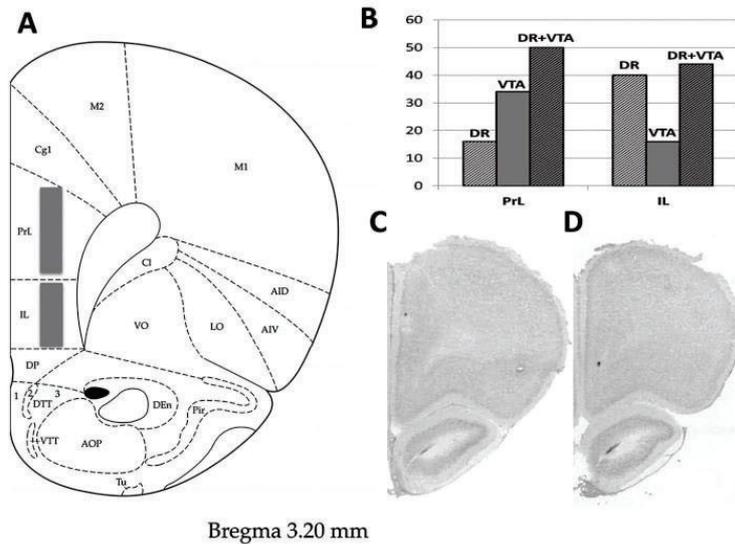
DR stimulation evoked different response types in PrL neurons, with 18/50 inhibitions (36%), 10/50 biphasic responses (20%) 4/50 orthodromic excitations (8%) and 18/50 (36%) of unresponsive neurons. In contrast, DR stimulation mainly inhibited pyramidal neurons in IL (39/61 neurons, 64%), together with much smaller percentage of biphasic responses (12/61 neurons, 20%) and of unresponsive neurons (10/61 cases, 16%). Remarkably, no orthodromic activations were found in IL. A Chi-square analysis revealed a significant difference ( $P < 0.01$ ) between the responses evoked by DR stimulation in PrL versus IL pyramidal neurons (Fig. 2).

Figures 3 and 4 show representative examples of the different types of responses evoked by DR stimulation in PrL and IL, respectively. Table 2 shows the characteristics of pure inhibitions and orthodromic activations, classified according to the recording site (PrL and IL). There were no significant regional differences with the exception of the latency of inhibitions, which were significantly lower in IL than in PrL:  $10 \pm 1$  ms ( $n = 39$ , IL) versus  $16 \pm 3$  ms ( $n = 18$ ; PrL) ( $P < 0.05$  Student's *t*-test). We also observed a significant difference in the latency of the inhibition of biphasic responses between both areas, lower in IL than in PrL:  $8 \pm 2$  ms ( $n = 12$ ; IL) versus  $14 \pm 2$  ms ( $n = 10$ ; PrL) ( $P < 0.05$ ; Student's *t*-test) (Fig. 5, Table 3).

### Pharmacological characterization of the responses evoked by DR stimulation in mPFC neurons

Given the large percentage of pyramidal neurons expressing 5-HT<sub>1A</sub>-R and/or 5-HT<sub>2A</sub>-R in different subdivisions and layers of the mPFC (Santana et al. 2004; Santana and Artigas 2017), and the involvement of such receptors in 5-HT-mediated inhibitions and excitations, (Araneda and Andrade 1991; Amargós-Bosch et al. 2004; Puig et al. 2005), we examined the reversal of DR-evoked inhibitions and excitations with the selective 5-HT<sub>1A</sub>-R and 5-HT<sub>2A</sub>-R antagonists WAY-100635 and M100907, respectively. As orthodromic activations were extremely rare (4 out of a total of 111 recordings), we attempted to reverse the excitatory phase of the more frequently encountered biphasic responses. Moreover, in an earlier study (Puig et al. 2005), we suggested the existence of a direct GABAergic projection from DR to mPFC, contributing to DR-evoked inhibitions, which was subsequently identified by histological means (Bang and Commons 2012). Furthermore, mPFC layer V pyramidal neurons are very sensitive to the blockade of 5-HT<sub>3</sub>-R (Riga et al. 2016). We therefore examined the potential contribution of these 2 additional components of DR-evoked inhibitions, mediated by GABA<sub>A</sub>-R activation and 5-HT<sub>3</sub>-R blockade, respectively.

In 9 different experiments (1 neuron per rat), the administration of the 5-HT<sub>1A</sub>-R antagonist WAY-100635 (100  $\mu$ g/kg i.v.) significantly attenuated the inhibitory



**Fig. 1.** (A) Schematic representation of the recording areas (shaded rectangles) in the PrL and IL subdivisions of the mPFC. Recordings were made in layer V pyramidal neurons identified by antidromic stimulation from midbrain (dorsal raphe nucleus, DR and/or VTA). Average DV coordinates of PrL and IL recorded neurons were  $-2.11 \pm 0.07$  mm ( $n = 50$ ) and  $-3.69 \pm 0.05$  mm ( $n = 61$ ), respectively. Section modified from Paxinos and Watson (2005). (B) Proportion of pyramidal neurons in PrL ( $n = 50$ ) and IL ( $n = 61$ ) projecting to DR, VTA or both. (C) and (D) are examples of coronal sections showing the location of recording sites of midbrain-projecting pyramidal neurons in PrL (C) and IL (D).

**Table 1.** Characteristics of the different responses evoked in mPFC pyramidal neurons by DR stimulation.

	Inhibitions (I) ( $n = 57$ )	OA ( $n = 4$ )
Latency (ms)	$12 \pm 1$	$46 \pm 6$
Duration (ms)	$137 \pm 10$	$157 \pm 22$
Prestimulus firing (spikes/s)	$1.3 \pm 0.3$	$0.4 \pm 0.3$
Poststimulus firing (spikes/s)	$0.3 \pm 0.1$	$3.6 \pm 1.4$
% response <sup>a</sup>	$12 \pm 2$	$49 \pm 15$
BR ( $n = 22$ )		
Prestimulus firing (spikes/s)	$0.89 \pm 0.2$	
	Inhibition phase	Activation phase
Latency (ms)	$11 \pm 1$	$98 \pm 8$
Duration (ms)	$58 \pm 5$	$86 \pm 11$
Poststimulus firing (spikes/s)	$0.0 \pm 0.0$	$4.3 \pm 0.6$
% response <sup>a</sup>	$4 \pm 2$	$39 \pm 9$

Note: <sup>a</sup>The percentage of response for the inhibitory and excitatory responses was calculated as % of firing rate and as success rate, respectively.

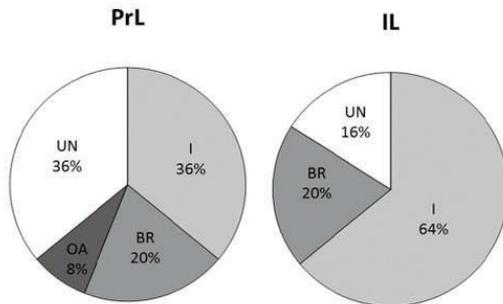
responses induced by DR stimulation. Hence, the percentage of firing during the inhibition was significantly enhanced by WAY-100635 administration (from  $7 \pm 4\%$  to  $77 \pm 25\%$  of prestimulus firing rate;  $P < 0.02$ ; paired Student's *t*-test;  $n = 9$ ) (Fig. 6A–A').

Similarly, the administration of the 5-HT<sub>3</sub>-R antagonist ondansetron ( $1,28$  mg/kg i.v.) significantly reduced the inhibitory action of DR stimulation on pyramidal neurons, increasing the percentage of firing during the inhibition (from  $8 \pm 5\%$  to  $36 \pm 7\%$  of prestimulus firing rate;  $P < 0.02$ ; paired Student's *t*-test;  $n = 7$ ) (Fig. 6B–B').

The contribution of GABA<sub>A</sub>-R to inhibitory responses in pyramidal neurons, likely mediated by a direct DR-mPFC

GABAergic pathway (Puig et al. 2005; Bang and Commons 2012) was assessed using the GABA<sub>A</sub>-R antagonist picrotoxinin ( $2$  mg/kg i.v.). This agent significantly increased the percentage of firing during the inhibition (from  $3 \pm 3\%$  to  $134 \pm 31\%$  of prestimulus firing rate;  $P < 0.01$ ; paired Student's *t*-test;  $n = 7$ ) and markedly reduced the duration of the inhibitory responses (from  $143 \pm 32$  to  $46 \pm 18$  ms;  $P < 0.01$ ; paired Student's *t*-test;  $n = 7$ ). Finally, picrotoxinin also significantly enhanced the poststimulus firing rate (from  $0.0 \pm 0.0$  to  $1.1 \pm 0.4$  spikes/s;  $P < 0.05$ ; paired Student's *t*-test;  $n = 7$ ) (Fig. 6C–C').

On the other hand, the administration of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist M100907 ( $300$   $\mu$ g/kg i.v.) completely



**Fig. 2.** Pie charts showing the proportions of the different response types evoked in layer V pyramidal neurons of PrL and IL cortices by DR stimulation at a physiological rate (0.9 Hz). Representative examples of each response type in PrL and IL can be seen in Figures 3 and 4, respectively. Note 1) the greater proportion of responding neurons in IL compared with PrL (84% vs. 64%, respectively), 2) the predominance of inhibitory (I) responses in IL (64%, equal to the sum of all responding neurons in PrL), and 3) the lack of pure OA in IL. In contrast, the proportion of BR was the same in both subdivisions (20%) ( $P < 0.01$ ; Chi-square test).

**Table 2.** Characteristics of the pure inhibitory and excitatory responses evoked in PrL and IL pyramidal neurons by DR stimulation.

Responses to DR stimulation	PrL	IL
Inhibition (I)	$n = 18$	$n = 39$
Latency (ms)	$16 \pm 3$	$10 \pm 1^*$
Duration (ms)	$118 \pm 10$	$146 \pm 14$
Prestimulus firing (spikes/s)	$1.0 \pm 0.2$	$1.5 \pm 0.4$
Poststimulus firing (spikes/s)	$0.2 \pm 0.1$	$0.3 \pm 0.1$
% firing during inhibition	$13 \pm 2$	$11 \pm 2$
OA	$n = 4$	
Latency (ms)	$46 \pm 6$	
Duration (ms)	$157 \pm 22$	
Prestimulus firing (spikes/s)	$0.4 \pm 0.3$	
Poststimulus firing (spikes/s)	$3.6 \pm 1.4$	
Success rate (%)	$49 \pm 15$	

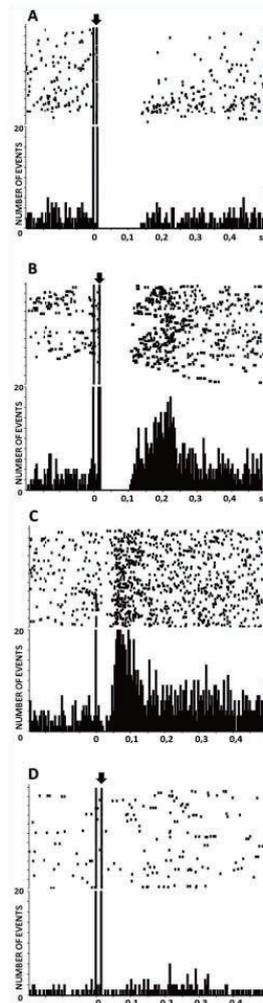
\*  $P < 0.02$  versus PrL.

**Table 3.** Characteristics of the biphasic responses evoked in PrL and IL pyramidal neurons by DR stimulation.

BR	PrL ( $n = 10$ )	IL ( $n = 12$ )
Prestimulus firing (spikes/s)	$1.1 \pm 0.3$	$0.8 \pm 0.3$
Inhibition phase		
Latency (ms)	$14 \pm 2$	$8 \pm 2^*$
Duration (ms)	$56 \pm 8$	$61 \pm 7$
Poststimulus firing (spikes/s)	$0.0 \pm 0.0$	$0.0 \pm 0.0$
% firing during inhibition	$6 \pm 4$	$3 \pm 2$
Activation phase		
Latency (ms)	$101 \pm 16$	$95 \pm 7$
Duration (ms)	$102 \pm 18$	$73 \pm 11$
Poststimulus firing (spikes/s)	$5.0 \pm 1.0$	$3.8 \pm 0.6$
Success rate (%)	$55 \pm 17$	$25 \pm 4^{**}$

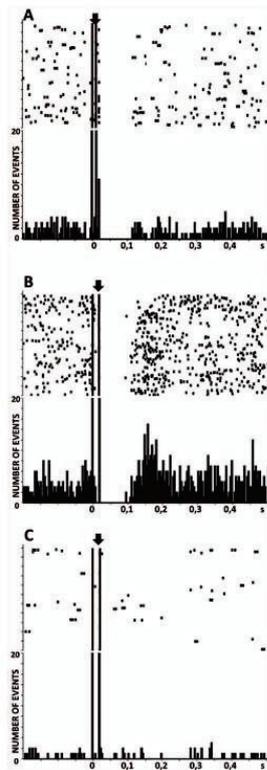
\*  $P < 0.02$  versus PrL. \*\*  $P = 0.076$ , marginally significant.

blocked the biphasic and excitatory responses evoked by DR stimulation in 7/10 PrL neurons. In those neurons, we found significant differences in both poststimulus firing



**Fig. 3.** PSTH and raster plots showing representative examples of the different responses induced in layer V PrL pyramidal neurons by DR stimulation (0.9 Hz). (A) Pure inhibitory response; (B) Biphasic response; (C) Pure ortodromic activation; (D) Unresponsive neuron. Arrowheads mark antidromic spikes. The neurons in (A, B, and D) projected to DR or DR and VTA, whereas the neuron in (C) projected only to VTA (note the absence of the antidromic spike).

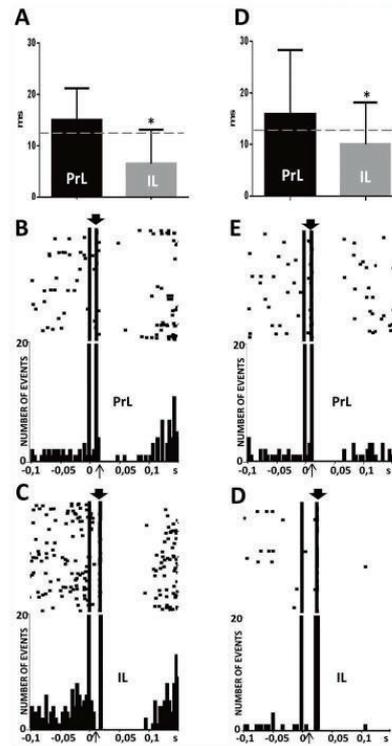
pre- and post-M100907 administration ( $3.9 \pm 0.6$  spikes/s vs.  $1.5 \pm 0.7$  spikes/s, respectively;  $P < 0.01$ ; paired Student's *t*-test;  $n = 7$ ), and in the percentage of response to stimulation pre- and postdrug administration ( $29 \pm 8\%$  vs.  $7 \pm 3\%$  respectively;  $P < 0.05$ ; paired Student's *t*-test;  $n = 7$ ) (Fig. 7A–A'). However, in the rest of neurons ( $n = 3$ ) M100907 actually enhanced excitatory phase of the biphasic response (Fig. 7B–B'), an effect perhaps due to the blockade of 5-HT<sub>2A</sub> receptors in GABAergic interneurons controlling the activity of the recorded unit (see discussion below).



**Fig. 4.** PSTH and raster plots showing representative examples of the different responses induced in layer V IL pyramidal neurons by dorsal raphe (DR) stimulation (0.9 Hz). (A) Pure inhibitory response, (B) biphasic response, and (C) unresponsive neuron. Arrowheads mark antidromic spikes.

## Discussion

The present study reveals the existence of very marked regional differences in the *in vivo* modulation of pyramidal neuron activity by 5-HT in rat mPFC, with a remarkable inhibitory action in IL, where a very large proportion (84%) of pyramidal neurons were sensitive to DR stimulation, mostly responding with inhibitions (64%) or biphasic responses (20%). Inhibitory responses were mediated by at least 3 different mechanisms, namely the direct activation of 5-HT<sub>1A</sub>-R and GABA<sub>A</sub>-R in pyramidal neurons and the activation of excitatory 5-HT<sub>3</sub>-R in local GABA interneurons controlling the activity of layer V pyramidal neurons. Using the same methodology, we previously reported on the *in vivo* actions of 5-HT on pyramidal neurons of the Cg and PrL subdivisions of the rat mPFC (Puig et al. 2005). To our knowledge, no further study examined the serotonergic modulation of pyramidal neuron activity in IL nor examined potential regional differences within the mPFC. Given the key role of vACC—and of IL in rodent models—in emotional control and in MDD pathophysiology and treatment (see Introduction), the present data make up a relevant

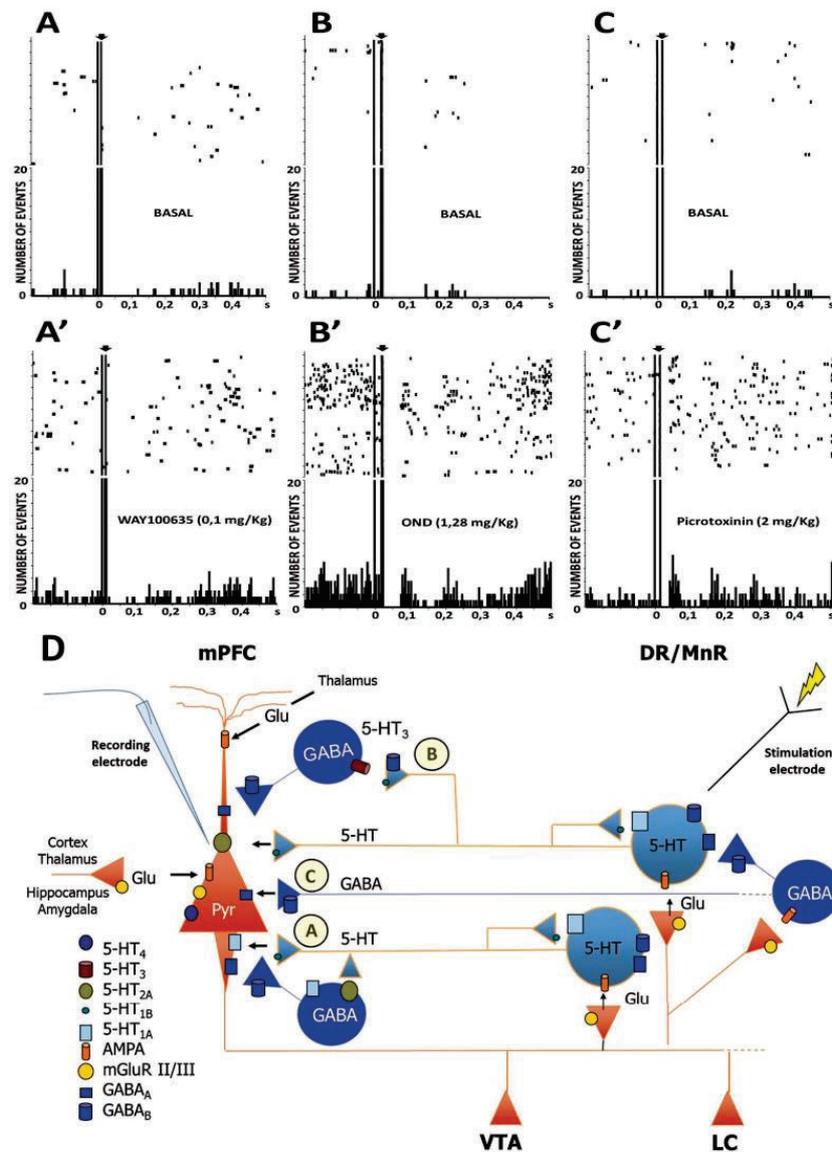


**Fig. 5.** Latency of inhibitory responses in PrL and IL pyramidal neurons evoked by DR stimulation (0.9 Hz). Panels (A, B, C) show the inhibitory phase of biphasic responses whereas panels (D, E, F) correspond to pure inhibitory responses. (A, D) Bar graphs showing the mean  $\pm$  SEM latencies of the inhibitory phase of biphasic responses (A) and pure inhibitory responses (D) in PrL and IL. (\* $P < 0.02$  vs. PrL). The dashed line marks the mean value of antidromic potentials ( $13 \pm 1$  ms,  $n = 84$ ). Panels (B, C, E, and F) are representative PSTHs and raster plots of biphasic responses (B, C) and pure inhibitions (E, F) showing the initial 150 ms poststimulus period in PrL and IL. Note the beginning of inhibitory responses (thin arrows) before antidromic spikes (arrowheads) in IL.

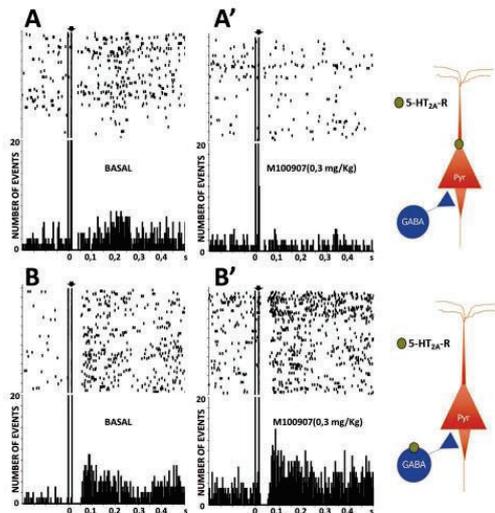
piece of information to better understand the role of the 5-HT system in PFC-dependent mood regulation and its potential relevance for MDD treatment.

### Differential sensitivity of IL and PrL to DR stimulation.

The larger proportion of DR-sensitive neurons in IL (84%) versus PrL (64%), together with the greater percentage of pure inhibitory responses in IL (64%) than in PrL (36%) indicates a much greater inhibitory action of 5-HT in IL than in PrL. Interestingly, pure orthodromic activations, found in a small percentage (8%) of PrL pyramidal neurons, were absent in IL, whereas biphasic responses were similar in both mPFC subdivisions. Biphasic responses are likely accounted for by the high cellular co-expression of 5-HT<sub>1A</sub>-R and 5-HT<sub>2A</sub>-R in mPFC (Amargós-Bosch et al. 2004). Pyramidal neurons in IL exert a phasic inhibitory influence on PrL pyramidal neurons (Ji and Neugebauer 2012). Given the remarkable



**Fig. 6.** Reversal of the inhibitory responses induced by DR stimulation in mPFC layer V pyramidal neurons by the 5-HT<sub>1A</sub>-R antagonist WAY-100635 (0.1 mg/kg i.v.) (A-A'), the 5-HT<sub>3</sub>-R antagonist ondansetron (OND, 1.28 mg/kg i.v.) (B-B'), and the GABA<sub>A</sub>-R antagonist picrotoxinin (PIC, 2 mg/kg i.v.) (C-C'). PSTH and raster plots in (A, B, C) correspond to the basal condition and those in (A', B', C') were recorded after the administration of the corresponding antagonist. Neurons in (A) and (B) were from IL and that in (C) was from PrL. Note the reduction of the inhibitory response together with a generalized increase in firing after the administration of each receptor antagonist. (D) Schematic representation of the reciprocal interaction between mPFC and the dorsal and median raphe nuclei (DR/MnR), together the 3 main mechanisms involved in inhibitory responses recorded in layer V pyramidal neurons of IL and PrL: (A) direct activation of 5-HT<sub>1A</sub>-R in pyramidal neurons by 5-HT released from serotonergic axons, (B) activation of 5-HT<sub>3</sub>-R in superficial GABA interneurons controlling layer I thalamic inputs reaching the tufts of apical dendrites, and (C) activation of GABA<sub>A</sub>-R in pyramidal neurons by a direct DR-mPFC GABA pathway (see Discussion for an extended description on these mechanisms). A putative 4th mechanism involving the activation of 5-HT<sub>2A</sub>-R in local GABA interneurons and the subsequent inhibition of pyramidal neurons (not shown in the scheme) is suggested by the enhanced excitatory phase of biphasic responses in pyramidal neurons after 5-HT<sub>2A</sub>-R blockade (see Fig. 7). Scheme in (D) was redrawn and adapted from Artigas (2015).



**Fig. 7.** Effects of the 5-HT<sub>2A</sub>-R antagonist M100907 on the excitatory phase of biphasic responses evoked by DR stimulation in PrL. PSTH and raster plots showing the biphasic response during DR stimulation in basal conditions (A, B) and after M100907 administration (300  $\mu$ g/kg i.v.) (A', B'). In 7 out of 10 experiments performed, the excitatory phase was markedly reduced by M100907, as shown in panels (A–A'), indicating that M100907 blocked the activation of 5-HT<sub>2A</sub>-R in pyramidal neurons. However, in the rest of experiments ( $n = 3$ ), M100907 administration actually enhanced the excitatory phase of biphasic responses, as shown in panels (B–B'), suggesting the blockade of 5-HT<sub>2A</sub>-R in GABA interneurons controlling the activity of the recorded pyramidal neuron, which may or may not express 5-HT<sub>2A</sub>-R.

inhibitory effect of DR stimulation on IL neurons, this may contribute to disinhibit pyramidal neurons and to enhance excitatory responses in PrL. Overall, the present *in vivo* data support the view that 5-HT plays a major role in PFC-dependent functions (Robbins and Arnsten 2009) through the modulation of a very large proportion of projection pyramidal neurons, with a greater inhibitory action in IL than in PrL or Cg (Puig et al. 2005; present study).

### Receptor mechanisms involved

The inhibitory action of DR stimulation on IL and PrL neurons appears to involve at least 3 different components, 1) the direct activation of 5-HT<sub>1A</sub>-R in pyramidal neurons, 2) the activation of excitatory ionotropic 5-HT<sub>3</sub>-R on local GABA interneurons controlling pyramidal neuron activity, and 3) the activation of GABA<sub>A</sub>-R by a direct GABAergic DR-mPFC pathway. A 4th mechanism, involving the activation of 5-HT<sub>2A</sub>-R in local GABA interneurons is suggested by the paradoxical enhancement of excitatory responses after 5-HT<sub>2A</sub>-R blockade with M100907 (see below).

The greater proportion of 5-HT-mediated inhibitions in IL is consistent with the greater neuronal proportion expressing 5-HT<sub>1A</sub>-R than 5-HT<sub>2A</sub>-R in this cortical area, including layer V pyramidal neurons (55% vs. 22%, respectively; Santana and Artigas 2017a). In PrL, and

despite the similar proportion of layer V pyramidal neurons expressing 5-HT<sub>1A</sub>-R- and -HT<sub>2A</sub>-R (52% and 55%, respectively; Santana and Artigas 2017a), DR stimulation evoked more inhibitory responses (36%) than orthodromic activations (8%), together with a 20% of biphasic responses. The higher proportion of inhibitory responses agrees with previous *in vitro* and *in vivo* studies (Ashby et al. 1990, 1994; Araneda and Andrade 1991; Amargós-Bosch et al. 2004; Puig et al. 2005; see Celada et al. 2013 for review), supporting a main inhibitory role of 5-HT in PFC, despite the expression of excitatory 5-HT receptors such as 5-HT<sub>2A</sub>-R, 5-HT<sub>2C</sub>-R and 5-HT<sub>4</sub>-R by pyramidal neurons (Santana et al. 2004; Lucas et al. 2005; Peñas-Cazorla and Vilaró 2015; Santana and Artigas 2017b).

This preferential inhibitory action may be due to several factors, including 1) the very large percentage of pyramidal neurons expressing 5-HT<sub>1A</sub>-R in all mPFC subdivisions (Santana et al. 2004), 2) the higher affinity of 5-HT for 5-HT<sub>1A</sub>-R versus 5-HT<sub>2A</sub>-R, 3) the coupling of 5-HT<sub>1A</sub>-R to K<sup>+</sup> channels, which leads to immediate changes in membrane potential and neuronal discharge, and 4) the localization of 5-HT<sub>1A</sub>-R in the axon hillock of pyramidal neurons (De Felipe et al. 2001), where 5-HT may establish axo-axonic synapses similar to those of GABA (Somogyi et al. 1998), with a direct influence on the generation of action potentials.

The present data also supports the involvement of 5-HT<sub>3</sub>-R in the inhibitory responses induced by DR stimulation. 5-HT<sub>3</sub>-R are expressed by calbindin- and calretinin- (but not parvalbumin)-containing GABA interneurons, located in superficial cortical layers (I–III) (Morales and Bloom 1997; Puig et al. 2004; Santana and Artigas 2017a). Early *in vitro* studies showed that 5-HT and 5-HT<sub>3</sub>-R agonists suppressed pyramidal neuron activity in rat PFC through the activation of 5-HT<sub>3</sub> receptors (Ashby et al. 1989, 1991, 1992), though the increase of inhibitory postsynaptic currents resulting from the activation of 5-HT<sub>3</sub>-R in local GABAergic interneurons (Zhou and Hablitz 1999; Férezou et al. 2002; Xiang and Prince 2003). Subsequent *in vivo* studies showed that DR stimulation evoked fast *in vivo* excitatory responses in superficial GABA interneurons (Puig et al. 2004) and 5-HT<sub>3</sub>-R blockade enhanced the discharge rate of a very large proportion (~70%) of layer V mPFC pyramidal neurons (Riga et al. 2016). The present results agree with this previous literature and show that 5-HT<sub>3</sub>-R are major components of inhibitory responses evoked by DR stimulation in PrL and IL pyramidal neurons *in vivo*.

Hence, despite 5-HT<sub>3</sub>-R are expressed by a relatively small population of GABA interneurons in layers I–III of mPFC (Puig et al. 2004; Santana and Artigas 2017a), they exert a profound influence on a large proportion of layer V pyramidal neurons (Riga et al. 2016; present study). The reason(s) for this remarkable influence are not fully understood but may involve the control by 5-HT<sub>3</sub>-R-expressing interneurons of thalamocortical inputs in layer I reaching the apical dendrites of pyramidal neurons (Jones 2001; Rubio-Garrido et al. 2009)

(see scheme in Fig. 6). In this manner, 5-HT<sub>3</sub>-R located in superficial layers could modulate the interplay between the thalamic matrix, the PFC and subcortical structures innervated by layer V neurons, including the brainstem monoamine nuclei.

Anatomical and electrophysiological studies support the existence of a direct reciprocal innervation and mutual control between the mPFC and the DR (Hajós et al. 1998; Celada et al. 2001; Gabbott et al. 2005; Puig et al. 2005), a circuit involved in mood control and resilience to stress (Warden et al. 2012). In addition to the well-known ascending serotonergic projection, the DR-mPFC pathway also includes a direct GABAergic projection, as supported by electrophysiological (Puig et al. 2005; present study) and anatomical studies using GAD67-GFP (green fluorescent protein) knock-in mice (Bang and Commons 2012).

Despite a substantial proportion of DR 5-HT neurons co-express GAD and may corelease GABA (Okaty et al. 2019; Ren et al. 2019), the short-latency inhibitory responses evoked by DR stimulation cannot be explained by GABA co-release from 5-HT axons, given the conduction velocity of 5-HT axons, slower than that of glutamate or GABA axons. Hence, the latency of antidromic spikes evoked in DR 5-HT neurons by mPFC stimulation was  $25 \pm 3$  ms (Hajós et al. 1998). Therefore, the  $10 \pm 1$  ms latency of pure inhibitory responses (or the  $8 \pm 2$  ms of the inhibitory phase of biphasic responses) observed in IL after DR stimulation cannot be due to GABA co-release from 5-HT axons, since this should necessarily occur  $> 25$  ms after DR stimulation.

Therefore, the present observations give further support to this DR-mPFC GABA projection, accounting for short-latency inhibitions in pyramidal neurons. In the present experimental conditions, this GABAergic component appears to be more marked in IL than in PrL, as judged by the shorter latency of pure inhibitory responses and biphasic responses in IL versus PrL (Tables 2 and 3). The latency of GABA-mediated inhibitory responses (pure or biphasic) is in excellent agreement with that previously found ( $9 \pm 1$  ms; Puig et al. 2005). However, unlike in that previous study, the mean latency of inhibitions in PrL was not below antidromic spikes ( $13 \pm 1$  ms). Given the robustness of both studies, with large neuronal numbers and using the same methodology, this apparent discrepancy may be due to slight differences in the placement of stimulation electrodes within the DR, since GAD67+ cells are heterogeneously distributed within the DR (Bang and Commons 2012; Ren et al. 2019), and there is no detailed information on the projection areas of the different neuronal subsets. Further studies are required to examine the exact connectivity of DR projection GABA neurons with PFC subdivisions as well as their role in PFC function and MDD treatment.

Excitatory responses were mediated by 5-HT<sub>2A</sub>-R, although M100907 paradoxically enhanced excitatory responses in 3/10 neurons examined (Fig. 7). This effect

is possibly mediated by the blockade of 5-HT<sub>2A</sub>-R in GABA interneurons (Santana et al. 2004) controlling the activity of the recorded units. This view is in agreement with the dual effect of the preferential 5-HT<sub>2A</sub>-R agonist DOI on mPFC pyramidal discharge (Puig et al. 2003; Wood et al. 2012), being inhibitory responses reversed by M100907 and by PIC (Puig et al. 2003).

### Relevance for MDD treatment

As summarized in the introduction, the vACC plays a major role in MDD pathophysiology and treatment. Likewise, rodent data obtained in recent years support a critical role of IL (but not PrL) in depressive- and antidepressant-like behaviors. Given its reciprocal connectivity and top-down control of cortical and subcortical areas by the PFC (including the brainstem monoamine nuclei; Groenewegen and Uylings 2000; Gabbott et al. 2005), a hyperactive vACC may exert an excessive top-down inhibitory control of subcortical areas, leading to the emergence of MDD symptoms; ((Artigas 2021) Supplementary Fig. 1). This view is apparently supported by recent rodent data showing that a marked and persistent increase of excitatory neurotransmission in IL results in depressive-like behavior in mice, together with a reduction of serotonergic function and of BDNF expression (Fullana et al. 2019, 2019, 2020). Likewise, anxiety behavior is associated with an enhanced activity of IL pyramidal neurons in mice (Berg et al. 2019).

Therefore, the reduction of vACC hyperactivity may be seen as a regional mechanistic target in antidepressant drug development, as it would normalize neuronal activity in MDD-relevant subcortical areas innervated by vACC. In this regard, the depressive-like behavior exhibited by mice with IL glutamatergic hyperactivity (Fullana et al. 2019, 2019) was normalized by acute citalopram and ketamine treatment (10 mg/kg each; Fullana et al. 2019). Pilot observations indicate that citalopram enhances the inhibitory action of DR stimulation in IL (Supplementary Fig. 2). In line with these observations, a very recent study revealed that subchronic (21 days) fluoxetine treatment reduced the basal firing activity of mPFC pyramidal neurons in rats (Yin et al. 2021). Likewise, ketamine i.v. infusion attenuated a task-driven hyperactivity of vACC in MDD patients (Morris et al. 2020).

On the other hand, DBS of vACC (Brodmann areas 25) evoked antidepressant effects in treatment-resistant MDD patients (Mayberg et al. 2005; Puigdemont et al. 2012; Riva-Posse et al. 2020; see however Holtzheimer et al. 2017). In the rat, DBS of IL (but not of PrL) evoked antidepressant-like effects (Jiménez-Sánchez et al. 2016), supporting the relevance of IL in rodent models of MDD.

Similarly, the activation of 5HT<sub>1A</sub>-R in mPFC by the preferentially postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub>-R agonist NLX-101 evoked antidepressant-like effects in rats (Depoortère et al. 2021). Finally, and given the remarkable role of

GABAergic neurotransmission in DR-mediated inhibitions, the rapid antidepressant action of positive allosteric modulators of GABA<sub>A</sub>-R such as brexanolone and SAGE-217 (Kanes et al. 2017; Gunduz-Bruce et al. 2019) might involve, among others, an attenuation of glutamatergic hyperactivity in vACC through an enhancement of GABAergic function in this cortical area.

### Study limitations

An important limitation is the use of anesthesia, which prevents the direct translation of the present data to behaving rats. Indeed, the present study was prompted by recent studies supporting a key role of IL in animal models of MDD pathophysiology and treatment (see Introduction). The methods employed, including the use of chloral hydrate anesthesia, allowed a direct comparison with a previous study (Puig et al. 2005) examining the action of 5-HT in other PFC subfields (Cg, PrL, M2), but not in IL.

A second limitation is the lack of a methodology to selectively stimulate the ascending 5-HT and GABA projections from the DR to mPFC. The interplay between DR 5-HT and GABA neurons (Weissbourd et al. 2014) together with the co-expression of both transmitters in 5-HT neurons (Okaty et al. 2019; Ren et al. 2019) and the existence of a direct DR-mPFC GABAergic pathway makes it necessary to clarify the relative role of ascending 5-HT and GABA projections to IL and PrL. Further studies using optogenetics will shed new light into this issue.

A final limitation of the study is the use of naïve rats. Indeed, testing the above hypothesis (Supplementary Fig. 1) requires the use of rodent MDD models. An extension of the present study to rats with a hyperactive IL is highly desirable.

### Concluding remarks

Notwithstanding the above limitations, the present study shows a highly remarkable and regionally selective inhibitory action of 5-HT on IL, where a large majority (84%) of the recorded neurons responded to DR stimulation with pure inhibitions (64%) or biphasic responses (20%). Given the major role played by 5-HT in MDD treatment, and the existence of a vACC hyperactivity in MDD patients (also of a depressive-like behavior in mice with a hyperactive IL), it is tempting to relate both sets of data, suggesting that the antidepressant action of 5-HT-enhancing drugs may involve an attenuation of glutamatergic hyperactivity in vACC. Further work is required to test this hypothesis, by examining whether drugs with antidepressant effects (e.g., SSRI/SNRI, postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub>-R agonists, ketamine, GABA<sub>A</sub>-R modulators, etc.) share the ability to inhibit neuronal hyperactivity in rodent models of MDD.

### Supplementary material

Supplementary material can be found at *Cerebral Cortex* online.

### Funding

Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (SAF2015-68346-P MINECO/FEDER, UE to F.A., PI16/00287 to P.C.; European Regional Development Fund “A way to build Europe.”; Instituto de Salud Carlos III, Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM); CERCA Programme from the Generalitat de Catalunya. The authors of this study would like to thank the support of the Secretaria d’Universitats i Recerca del Departament d’Economia i Coneixement de la Generalitat de Catalunya (2017SGR717). E.L.T. is recipient of a predoctoral contract from Spanish MINECO.

### Notes

We thank Verónica Paz and María Jaramillo for skillful technical and secretarial assistance, respectively. *Conflict of interest:* FA has received educational honoraria from Lundbeck and was PI of a grant agreement between IDIBAPS and Lundbeck. The rest of authors declare no conflict of interest.

### References

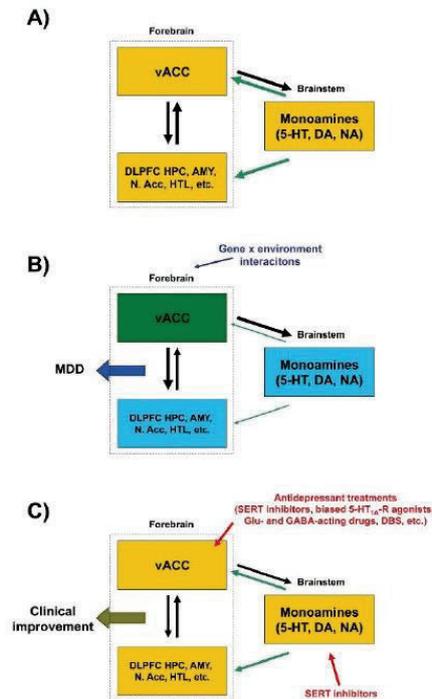
- Alexander L, Clarke HF, Roberts AC. 2019. A focus on the functions of area 25. *Brain Sci.* 9:1–33.
- Amargós-Bosch M, Bortolozzi A, Puig MV, Serrats J, Adell A, Celada P, Toth M, Mengod G, Artigas F. 2004. Co-expression and in vivo interaction of Serotonin1A and Serotonin2A receptors in pyramidal neurons of pre-frontal cortex. *Cereb Cortex.* 14:281–299.
- Andrews DG, Jenkins LM. 2019. The role of the amygdala and the ventromedial prefrontal cortex in emotional regulation: implications for post-traumatic stress disorder. *Neuropsychol Rev.* 29:220–243.
- Araneda R, Andrade R. 1991. 5-Hydroxytryptamine2 and 5-hydroxytryptamine1A receptors mediate opposing responses on membrane excitability in rat association cortex. *Neuroscience.* 40:399–412.
- Artigas F. 2015. Developments in the field of antidepressants, where do we go now? *Eur Neuropsychopharmacol.* 25:657–670.
- Artigas F. 2021. Brain circuitry in major depressive disorder: the critical role of ventral anterior cingulate cortex. *Eur Neuropsychopharmacol.* 51:134–137.
- Ashby CR, Edwards E, Harkins K, Wang RY. 1989. Characterization of 5-hydroxytryptamine3 receptors in the medial prefrontal cortex: a microiontophoretic study. *Eur J Pharmacol.* 173:193–196.
- Ashby CR, Edwards E, Wang RY. 1992. Action of serotonin in the medial prefrontal cortex: mediation by serotonin3-like receptors. *Synapse.* 10:7–15.
- Ashby CR, Edwards E, Wang RY. 1994. Electrophysiological evidence for a functional interaction between 5-HT1A and 5-HT2A receptors in the rat medial prefrontal cortex: an iontophoretic study. *Synapse.* 17:173–181.
- Ashby CR, Jiang LH, Kasser RJ, Wang RY. 1990. Electrophysiological characterization of 5-hydroxytryptamine2 receptors in the rat medial prefrontal cortex. *J Pharmacol Exp Ther.* 252:171–178.
- Ashby CR, Minabe Y, Edwards E, Wang RY. 1991. 5-HT3-like receptors in the rat medial prefrontal cortex: an electrophysiological study. *Brain Res.* 550:181–191.
- Bang SJ, Commons KG. 2012. Forebrain GABAergic projections from the dorsal raphe nucleus identified by using GAD67-GFP knock-in mice. *J Comp Neurol.* 520:4157–4167.

- Berg L, Eckardt J, Maseck OA. 2019. Enhanced activity of pyramidal neurons in the infralimbic cortex drives anxiety behavior. *PLoS One*. 14:e0210949.
- Blair RJR. 2007. The amygdala and ventromedial prefrontal cortex in morality and psychopathy. *Trends Cogn Sci*. 11:387–392.
- Burgos-Robles A, Vidal-Gonzalez I, Santini E, Quirk GJ. 2007. Consolidation of fear extinction requires NMDA receptor-dependent bursting in the ventromedial prefrontal cortex. *Neuron*. 53: 871–880.
- Celada P, Puig MV, Casanovas JM, Guillazo G, Artigas F. 2001. Control of dorsal raphe serotonergic neurons by the medial prefrontal cortex: involvement of serotonin-1A, GABA<sub>A</sub>, and glutamate receptors. *J Neurosci*. 21:9917–9929.
- Celada P, Victoria Puig M, Artigas F. 2013. Serotonin modulation of cortical neurons and networks. *Front Integr Neurosci*. 7:1–20.
- Dalley JW, Cardinal RN, Robbins TW. 2004. Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neurosci Biobehav Rev*. 28:771–784.
- De Felipe J, Arellano JI, Gómez A, Azmitia EC, Muñoz A. 2001. Pyramidal cell axons show a local specialization for GABA and 5-HT inputs in monkey and human cerebral cortex. *J Comp Neurol*. 433: 148–155.
- Delgado MR, Beer JS, Fellows LK, Huettel SA, Platt ML, Quirk GJ, Schiller D. 2016. Viewpoints: dialogues on the functional role of the ventromedial prefrontal cortex. *Nat Neurosci*. 19: 1545–1552.
- Depoortère R, Auclair AL, Newman-Tancredi A. 2021. NLX-101, a highly selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor biased agonist, mediates antidepressant-like activity in rats via prefrontal cortex 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Behav Brain Res*. 401:1–6.
- Drevets WC, Savitz J, Trimble M. 2008. The subgenual anterior cingulate cortex in mood disorders. *CNS Spectr*. 13:663–681.
- Férézou I, Cauli B, Hill EL, Rossier J, Hamel E, Lambolez B. 2002. 5-HT<sub>3</sub> receptors mediate serotonergic fast synaptic excitation of neocortical vasoactive intestinal peptide/cholecystokinin interneurons. *J Neurosci*. 22:7389–7397.
- Fuchikami M, Thomas A, Liu R, Wohleb ES, Land BB, DiLeone RJ, Aghajanian GK, Duman RS. 2015. Optogenetic stimulation of infralimbic PFC reproduces ketamine's rapid and sustained antidepressant actions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 112: 8106–8111.
- Fullana MN, Coveló A, Bortolozzi A, Araque A, Artigas F. 2019. In vivo knockdown of astroglial glutamate transporters GLT-1 and GLAST increases excitatory neurotransmission in mouse infralimbic cortex: relevance for depressive-like phenotypes. *Eur Neuropsychopharmacol*. 29:1288–1294.
- Fullana MN, Ruiz-Bronchal E, Ferrés-Coy A, Juárez-Escoto E, Artigas F, Bortolozzi A. 2019. Regionally selective knockdown of astroglial glutamate transporters in infralimbic cortex induces a depressive phenotype in mice. *Glia*. 67:1122–1137.
- Fullana N, Gasull-Camós J, Tarrés-Gatius M, Castañé A, Bortolozzi A, Artigas F. 2020. Astrocyte control of glutamatergic activity: downstream effects on serotonergic function and emotional behavior. *Neuropharmacology*. 166:107914.
- Fuller JH, Schlag JD. 1976. Determination of antidromic excitation by the collision test: problems of interpretation. *Brain Res*. 112: 283–298.
- Fuster J. 2008. *The prefrontal cortex*. 4th ed. Cambridge, MA, USA: Academic Press.
- Gabbott PLA, Warner TA, Jays PRL, Salway P, Busby SJ. 2005. Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *J Comp Neurol*. 492:145–177.
- Gasull-Camós J, Martínez-Torres S, Tarrés-Gatius M, Ozaita A, Artigas F, Castañé A. 2018. Serotonergic mechanisms involved in antidepressant-like responses evoked by GLT-1 blockade in rat infralimbic cortex. *Neuropharmacology*. 139:41–51.
- Gasull-Camós J, Soto-Montenegro ML, Casquero-Veiga M, Desco M, Artigas F, Castañé A. 2017. Differential patterns of subcortical activity evoked by glial GLT-1 blockade in prelimbic and infralimbic cortex: relationship to antidepressant-like effects in rats. *Int J Neuropsychopharmacol*. 20:988–993.
- Groenewegen HJ, Uylings HBM. 2000. The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information. *Prog Brain Res*. 126:3–28.
- Gunduz-Bruce H, Silber C, Kaul I, Rothschild AJ, Riesenberg R, Sankoh AJ, Li H, Lasser R, Zorumski CF, Rubinow DR, et al. 2019. Trial of SAGE-217 in patients with major depressive disorder. *N Engl J Med*. 381:903–911.
- Hajós M, Richards CD, Székely AD, Sharp T. 1998. An electrophysiological and neuroanatomical study of the medial prefrontal cortical projection to the midbrain raphe nuclei in the rat. *Neuroscience*. 87:95–108.
- Heilbronner SR, Rodríguez-Romaguera J, Quirk GJ, Groenewegen HJ, Haber SN. 2016. Circuit-based corticostriatal homologies between rat and primate. *Biol Psychiatry*. 80:509–521.
- Herculano-Houzel S, Watson C, Paxinos G. 2013. Distribution of neurons in functional areas of the mouse cerebral cortex reveals quantitatively different cortical zones. *Front Neuroanat*. 7:1–14.
- Hiser J, Koenigs M. 2018. The multifaceted role of the ventromedial prefrontal cortex in emotion, decision making, social cognition, and psychopathology. *Biol Psychiatry*. 83:638–647.
- Holtzheimer PE, Husain MM, Lisanby SH, Taylor SF, Whitworth LA, McClintock S, Slavin KV, Berman J, McKhann GM, Patil PG, et al. 2017. Subcallosal cingulate deep brain stimulation for treatment-resistant depression: a multisite, randomised, sham-controlled trial. *Lancet Psychiatry*. 4:839–849.
- Izquierdo A, Wellman CL, Holmes A. 2006. Brief uncontrollable stress causes dendritic retraction in infralimbic cortex and resistance to fear extinction in mice. *J Neurosci*. 26:5733–5738.
- Ji G, Neugebauer V. 2012. Modulation of medial prefrontal cortical activity using in vivo recordings and optogenetics. *Mol Brain*. 8(5):36.
- Jiménez-Sánchez L, Castañé A, Pérez-Caballero L, Grifoll-Escoda M, López-Gil X, Campa L, Galofré M, Berrocoso E, Adell A. 2016. Activation of AMPA receptors mediates the antidepressant action of deep brain stimulation of the infralimbic prefrontal cortex. *Cereb Cortex*. 26:2778–2789.
- Jones EG. 2001. The thalamic matrix and thalamocortical synchrony. *Trends Neurosci*. 24:595–601.
- Kanes S, Colquhoun H, Gunduz-Bruce H, Raines S, Arnold R, Schacterle A, Doherty J, Epperson CN, Deligiannidis KM, Riesenberg R, et al. 2017. Brexanolone (SAGE-547 injection) in postpartum depression: a randomised controlled trial. *Lancet*. 390: 480–489.
- Kargieman L, Santana N, Mengod G, Celada P, Artigas F. 2007. Antipsychotic drugs reverse the disruption in prefrontal cortex function produced by NMDA receptor blockade with phencyclidine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:14843–14848.
- Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. 2010. Improving bioscience research reporting: the arrive guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*. 8:6–10.
- Koenigs M, Grafman J. 2009. The functional neuroanatomy of depression: distinct roles for ventromedial and dorsolateral prefrontal cortex. *Behav Brain Res*. 201:239–243.

- Lingawi NW, Laurent V, Westbrook RF, Holmes NM. 2019. The role of the basolateral amygdala and infralimbic cortex in (re)learning extinction. *Psychopharmacology (Berl)*. 236:303–312.
- Lucas G, Compan V, Charnay Y, Neve RL, Nestler EJ, Bockaert J, Barrot M, Debonnel G. 2005. Frontocortical 5-HT<sub>4</sub> receptors exert positive feedback on serotonergic activity: viral transfections, subacute and chronic treatments with 5-HT<sub>4</sub> agonists. *Biol Psychiatry*. 57:918–925.
- Maren S, Quirk GJ. 2004. Neuronal signalling of fear memory. *Nat Rev Neurosci*. 5:844–852.
- Mayberg HS, Lozano AM, Voon V, McNeely HE, Seminowicz D, Hamani C, Schwab JM, Kennedy SH. 2005. Deep brain stimulation for treatment-resistant depression. *Neuron*. 45:651–660.
- Milad MR, Quinn BT, Pitman RK, Orr SP, Fischl B, Rauch SL. 2005. Thickness of ventromedial prefrontal cortex in humans is correlated with extinction memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:10706–10711.
- Milad MR, Quirk GJ. 2002. Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. *Nature*. 420:70–74.
- Milad MR, Wright CI, Orr SP, Pitman RK, Quirk GJ, Rauch SL. 2007. Recall of fear extinction in humans activates the ventromedial prefrontal cortex and hippocampus in concert. *Biol Psychiatry*. 62:446–454.
- Miller EK, Cohen JD. 2001. An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annu Rev Neurosci*. 24:167–202.
- Morales M, Bloom FE. 1997. The 5-HT<sub>3</sub> receptor is present in different subpopulations of GABAergic neurons in the rat telencephalon. *J Neurosci*. 17:3157–3167.
- Morris LS, Costi S, Tan A, Stern ER, Chamey DS, Murrrough JW. 2020. Ketamine normalizes subgenual cingulate cortex hyper-activity in depression. *Neuropsychopharmacology*. 45:975–981.
- Myers-schulz B, Koenigs M. 2012. Functional anatomy of ventromedial prefrontal cortex: implications for mood and anxiety disorders. *Mol Psychiatry*. 17:132–141.
- Nieuwenhuis ILC, Takashima A. 2011. The role of the ventromedial prefrontal cortex in memory consolidation. *Behav Brain Res*. 218:325–334.
- Okaty BW, Commons KG, Dymecki SM. 2019. Embracing diversity in the 5-HT neuronal system. *Nat Rev Neurosci*. 20:397–424.
- Paxinos G, Watson C. 2005. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 5th ed. New York, NY, USA: Academic Press.
- Peñas-Cazorla R, Vilaró MT. 2015. Serotonin 5-HT<sub>4</sub> receptors and forebrain cholinergic system: receptor expression in identified cell populations. *Brain Struct Funct*. 220:3413–3434.
- Peters J, Dieppa-Perea LM, Melendez LM, Quirk GJ. 2010. Induction of fear extinction with hippocampal-infralimbic BDNF. *Science* 328(80):1288–1290.
- Puig MV, Artigas F, Celada P. 2005. Modulation of the activity of pyramidal neurons in rat prefrontal cortex by raphe stimulation in vivo: involvement of serotonin and GABA. *Cereb Cortex*. 15:1–14.
- Puig MV, Celada P, Díaz-Mataix L, Artigas F. 2003. In vivo modulation of the activity of pyramidal neurons in the rat medial prefrontal cortex by 5-HT<sub>2A</sub> receptors: relationship to thalamocortical afferents. *Cereb Cortex*. 13:870–882.
- Puig MV, Santana N, Celada P, Mengod G, Artigas F. 2004. In vivo excitation of GABA interneurons in the medial prefrontal cortex through 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Cereb Cortex*. 14:1365–1375.
- Puigdemont D, Pérez-Egea R, Portella MJ, Molet J, De Diego-Adeliño J, Gironell A, Radua J, Gómez-Anson B, Rodríguez R, Serra M, et al. 2012. Deep brain stimulation of the subcallosal cingulate gyrus: further evidence in treatment-resistant major depression. *Int J Neuropsychopharmacol*. 15:121–133.
- Ren J, Isakova A, Friedmann D, Zeng J, Grutzner SM, Pun A, Zhao GQ, Kolluru SS, Wang R, Lin R, et al. 2019. Single-cell transcriptomes and whole-brain projections of serotonin neurons in the mouse dorsal and median raphe nuclei. *Elife*. 8:1–36.
- Riga MS, Sánchez C, Celada P, Artigas F. 2016. Involvement of 5-HT<sub>3</sub> receptors in the action of vortioxetine in rat brain: focus on glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *Neuropharmacology*. 108:73–81.
- Riva-Posse P, Crowell AL, Wright K, Waters AC, Choi KS, Garlow SJ, Holtzheimer PE, Gross RE, Mayberg HS. 2020. Rapid antidepressant effects of deep brain stimulation and their relation to surgical protocol. *Biol Psychiatry*. 88:e37–e39.
- Robbins TW, Arnsten AFT. 2009. The neuropsychopharmacology of fronto-executive function: monoaminergic modulation. *Annu Rev Neurosci*. 32:267–287.
- Roy M, Shohamy D, Wager TD. 2012. Ventromedial prefrontal-subcortical systems and the generation of affective meaning. *Trends Cogn Sci*. 16:147–156.
- Rubio-Garrido P, Pérez-De-Manzo F, Porrero C, Galazo MJ, Clascá F. 2009. Thalamic input to distal apical dendrites in neocortical layer 1 is massive and highly convergent. *Cereb Cortex*. 19:2380–2395.
- Santana N, Artigas F. 2017a. Laminar and cellular distribution of monoamine receptors in rat medial prefrontal cortex. *Front Neuroanat*. 11:1–13.
- Santana N, Artigas F. 2017b. Expression of serotonin 2C receptors in pyramidal and GABAergic neurons of rat prefrontal cortex: a comparison with striatum. *Cereb Cortex*. 27:3125–3139.
- Santana N, Bortolozzi A, Serrats J, Mengod G, Artigas F. 2004. Expression of serotonin<sub>1A</sub> and serotonin<sub>2A</sub> receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cereb Cortex*. 14:1100–1109.
- Seminowicz DA, Mayberg HS, McIntosh AR, Goldapple K, Kennedy S, Segal Z, Rafi-Tari S. 2004. Limbic-frontal circuitry in major depression: a path modeling metanalysis. *Neuroimage*. 22:409–418.
- Sierra-Mercado D, Padilla-Coreano N, Quirk GJ. 2011. Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology*. 36:529–538.
- Somogyi P, Tamás G, Lujan R, Buhl EH. 1998. Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain Res Rev*. 26:113–135.
- Swanson L. 2004. *Brain maps: structure of the rat brain*. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier.
- Uylings HBM, Groenewegen HJ, Kolb B. 2003. Do rats have a prefrontal cortex? *Behav Brain Res*. 146:3–17.
- Vázquez-Borsetti P, Celada P, Cortés R, Artigas F. 2011. Simultaneous projections from prefrontal cortex to dopaminergic and serotonergic nuclei. *Int J Neuropsychopharmacol*. 14:289–302.
- Vázquez-Borsetti P, Cortés R, Artigas F. 2009. Pyramidal neurons in rat prefrontal cortex projecting to ventral tegmental area and dorsal raphe nucleus express 5-HT<sub>2A</sub> receptors. *Cereb Cortex*. 19:1678–1686.
- Warden MR, Selimbeyoglu A, Mirzabekov JJ, Lo M, Thompson KR, Kim S, Adhikari A, Tye KM, Frank LM, Deisseroth K. 2012. A prefrontal cortex-brainstem neuronal projection that controls response to behavioural challenge. *Nature*. 492:428–432.

- Weissbourd B, Ren J, DeLoach KE, Guenther CJ, Miyamichi K, Luo L. 2014. Presynaptic partners of dorsal raphe serotonergic and GABAergic neurons. *Neuron*. 83:645–662.
- Wood J, Kim Y, Moghaddam B. 2012. Disruption of prefrontal cortex large scale neuronal activity by different classes of psychotomimetic drugs. *J Neurosci*. 32:3022–3031.
- Xiang Z, Prince DA. 2003. Heterogeneous actions of serotonin on interneurons in rat visual cortex. *J Neurophysiol*. 89:1278–1287.
- Yin YY, Wang YH, Liu WG, Yao JQ, Yuan J, Li ZH, Ran YH, Zhang LM, Li YF. 2021. The role of the excitation: inhibition functional balance in the mPFC in the onset of antidepressants. *Neuropharmacology*. 191:108573.
- Zhou FM, Hablitz JJ. 1999. Activation of serotonin receptors modulates synaptic transmission in rat cerebral cortex. *J Neurophysiol*. 82:2989–2999.

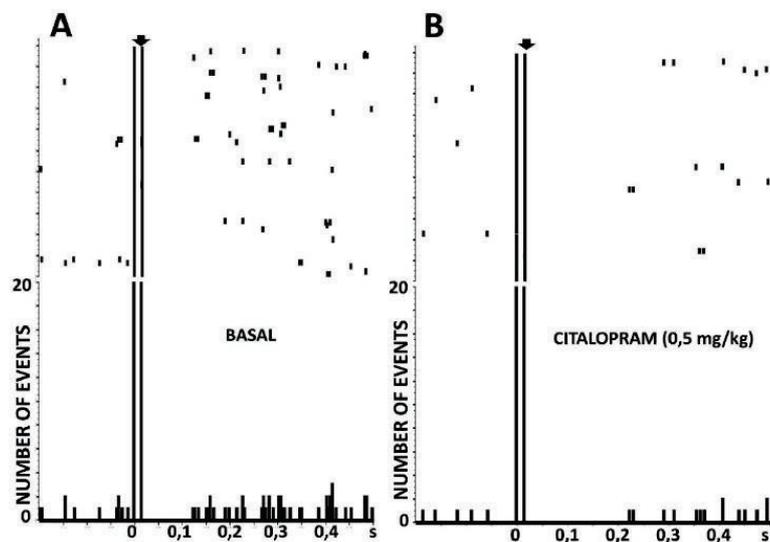
## Supplemental material



**Supplemental Figure 1.** The prefrontal cortex (PFC), including the ventral anterior cingulate cortex (vACC) is reciprocally connected with most subcortical areas\*, including the brainstem monoamine cell nuclei and limbic areas involved in mood control, and exerts a top-down control on their activity. A genetic- or environmentally-induced focal hyperactivity in vACC may translate into a generalized reduction of serotonergic activity in cortico-limbic areas, giving rise to MDD symptoms, as observed in rodents (Fullana et al., 2019a, 2019b, 2020). Clinical improvement may result from a normalization of serotonergic activity via 5-HT-enhancing drugs, and/or from the attenuation of glutamatergic hyperactivity in vACC, via different fast-acting mechanisms. The present data suggest that SERT inhibitors (e.g., SSRI, SNRI, etc.), may partly exert their therapeutic action via a preferential inhibitory action in IL, the rodent equivalent of vACC. Unlike SERT inhibitors, which required prolonged drug administration to overcome pre- and postsynaptic adaptive mechanisms in order to enhance the active 5-HT fraction, fast-acting antidepressant strategies may acutely normalize vACC hyperactivity, thus

normalizing the interplay with serotonergic (and possibly noradrenergic and dopaminergic) neurons. *Abbreviations used:* AMY, amygdala; DLPFC, dorso-lateral prefrontal cortex; DR, dorsal raphe nucleus; HPC, hippocampus; HTL, hypothalamus; MnR median raphe nucleus; NAcc, nucleus accumbens. Black arrows depict glutamatergic pathways and green arrows depict serotonergic pathways Adapted from Artigas 2005.

\*with the exception of the basal ganglia, which receive direct PFC inputs but sent nerve information back to PFC via the thalamus.



**Supplemental figure 2.** PTSH of an inhibitory response induced by DR stimulation (0.9 Hz) in a IL pyramidal neuron in basal conditions and after treatment with the SSRI citalopram (0.5 mg/kg i.v.). Note the increased duration of the inhibitory response and the decrease of pre- and post-stimulus discharge. Pilot observations (n=3) indicate significant differences in the duration of inhibitory responses between pre and post citalopram administration ( $113 \pm 5$  ms vs.  $188 \pm 17$  ms, respectively;  $p=0.02$ , Student's t-test). Citalopram enhanced by 66 % the duration of the inhibition.

---

# Trabajo 2

---

## **Differential modulation of dorsal raphe serotonergic activity in rat brain by the infralimbic and prelimbic cortices**

Elena López-Terrones<sup>1,2</sup>, Verónica Paz<sup>1,2</sup>, Leticia Campa<sup>1,2</sup>, Sara Conde-Berriozábal<sup>3,4,5</sup>, Mercé Masana<sup>3,4,5</sup>, Francesc Artigas<sup>1,2,3</sup>, Maurizio S. Riga<sup>6</sup>

(En preparación) *International Journal of Molecular Sciences*

1. Depart. de Neurociències i Terapèutica Experimental, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB-CSIC) 08036 Barcelona, Spain.
2. Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain.
3. Institut d' Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), 08036 Barcelona, Spain.
4. Depart. de Ciències Biomèdiques, Institut de Neurociències, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat de Barcelona, E-08036 Barcelona, Spain.
5. Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), E-08036 Barcelona, Spain.
6. Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER-CSIC), 41092 Sevilla, Spain.



## Differential modulation of dorsal raphe serotonergic activity in rat brain by the infralimbic and prelimbic cortices

Elena López-Terrones<sup>1,2</sup>, Verónica Paz<sup>1,2</sup>, Leticia Campa<sup>1,2</sup>, Sara Conde-Berriozábal<sup>3,4,5</sup>, Mercé Masana<sup>3,4,5</sup>, Francesc Artigas<sup>1,2,3</sup>, Maurizio S. Riga<sup>6\*</sup>

<sup>1</sup>Depart. de Neurociències i Terapèutica Experimental, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB-CSIC) 08036 Barcelona, Spain.

<sup>2</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain.

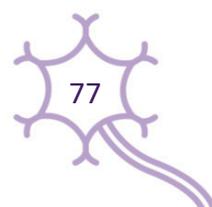
<sup>3</sup>Institut d' Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), 08036 Barcelona, Spain.

<sup>4</sup>Depart. de Ciències Biomèdiques, Institut de Neurociències, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat de Barcelona, E-08036 Barcelona, Spain.

<sup>5</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), E-08036 Barcelona, Spain.

<sup>6</sup>Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER-CSIC), 41092 Sevilla, Spain.

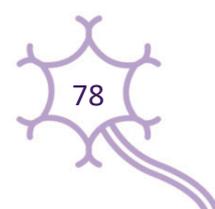
\*Address correspondence to: Maurizio S. Riga, Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER-CSIC), Av. Americo Vesputio 24, 41092 Sevilla, Spain. Email: [mauririga@gmail.com](mailto:mauririga@gmail.com).



## Abstract

The infralimbic (IL) cortex is the rodent equivalent of human ventral anterior cingulate cortex (vACC), which plays a crucial role in major depressive disorder (MDD). The modulation of glutamatergic neurotransmission in IL [but not in the adjacent prelimbic (PrL) cortex] triggers antidepressant-like or depressive-like behaviours, associated with changes in serotonin (5-HT) activity, underlying the importance of glutamate/serotonin interactions in IL for emotional processing. We therefore compared the *in vivo* effects of IL and PrL stimulations on 5-HT neuronal activity and release in the dorsal raphe nucleus (DR) of anesthetized rats. Both IL and PrL electrical stimulations at 0.9 Hz induced a preferential inhibitory effect on 5-HT neurons (53% vs 48%, respectively). Regional differences were found at increasing frequencies (10-20 Hz), where IL stimulation at 20 Hz evoked more changes in 5-HT neurons activity than PrL (86% vs. 59%, respectively). Responses of 5-HT neurons at 20 Hz IL stimulation were mediated by GABA<sub>A</sub> (but not 5-HT<sub>1A</sub>) receptors. Both electrical and optical stimulations of IL and PrL enhanced extracellular 5-HT concentration in DR in a frequency-dependent manner. More marked increases were found after the cessation of IL stimulation at 20 Hz. Overall, the present data support a differential control of serotonergic activity by IL and PrL, with an apparent superior role of IL, which may help to clarify brain circuits involved in MDD pathophysiology and treatment.

**Keywords:** infralimbic cortex, prelimbic cortex, 5-HT neurons, *in vivo* electrophysiology, intracerebral microdialysis.

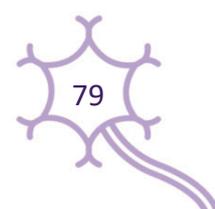


## 1. Introduction

The prefrontal cortex (PFC) is strongly involved in higher brain functions, many of which are altered in neuropsychiatric disorders. Hence, the dorsolateral PFC (e.g., Brodmann area 46), displays an important role in cognition whereas the ventral anterior cingulate cortex –vACC– (e.g. Brodmann area 25) plays a crucial role in mood and emotional control [1–5]. The PFC integrates information from primary and associative cortical areas as well as limbic and subcortical structures, such as the hippocampus, amygdala, hypothalamus, various nuclei of the limbic thalamus, and modulatory inputs from monoaminergic nuclei [raphe nuclei, 5-hydroxytryptamine or serotonin (5-HT); locus coeruleus, noradrenaline (NA); ventral tegmental area, dopamine (DA)]. The anatomical connectivity between the medial PFC (mPFC) and the brainstem monoamine nuclei is reciprocal, with mutual control of their activity [3,5–15]. Interestingly, this circuit is involved in the response to behavioural challenges [16].

The vACC is involved in the pathophysiology and treatment of mood and anxiety disorders [4,5,17,18]. Hence, vACC hyperactivity has been reported in patients with Major Depressive Disorder (MDD) [19,20], and deep brain stimulation (DBS) of the vACC results in clinical improvement in treatment-resistant MDD patients [21–23]. A recent neuroimaging study found that MDD patients had higher task-induced vACC hyperactivity than controls, which was normalized after a single dose of ketamine [24].

In terms of anatomical connections and function, the infralimbic (IL) cortex is considered as the rodent equivalent of the primate and human vACC and is deeply involved in antidepressant actions [4,25]. Optogenetic activation of IL in rats led to immediate and enduring antidepressant effects, similar to ketamine [26]. Furthermore, ketamine or the selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) citalopram had antidepressant-like effects when injected in IL, just as they did when administered systemically [26,27]. Additionally, the local blockage of the glial glutamate transporter GLT-1 in IL causes a transient increase in

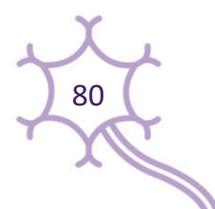


glutamatergic neurotransmission that triggers strong antidepressant effects in rats. These effects are presumably mediated by the modification of IL-raphé pathways given that it was linked to a rapid enhancement of serotonergic activity [28]. Remarkably, neither effect occurred when GLT-1 was blocked in PrL despite evoking comparable augmentation of extracellular glutamate than in IL [28].

On the other hand, a depressive-like phenotype was induced by a persistent regionally-selective downregulation of the glial glutamate transporters GLAST and GLT-1 caused by a local application of small interfering RNA (siRNA) in the mouse IL cortex. This effect was accompanied by a decrease in serotonergic activity and BDNF expression [29]. Citalopram and ketamine were effective in reversing the depressive-like phenotype. Remarkably, downregulating GLT-1 and GLAST in PrL did not result in behavioural or neurochemical changes [30].

Overall, the above observations add to previous literature on the relevant role of IL (and of vACC in humans) in mood control and strongly suggest a differential modulation of serotonergic activity by IL and PrL. On the other hand, IL and PrL express inhibitory (5-HT<sub>1A</sub>) and excitatory (5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>3</sub>) receptors in various cortical layers [31] which modulate the activity of a large percentage of pyramidal neurons in IL and PrL (84% and 64%, respectively). Interestingly, DR stimulation at physiological rates induced a greater inhibitory action in IL than PrL [15].

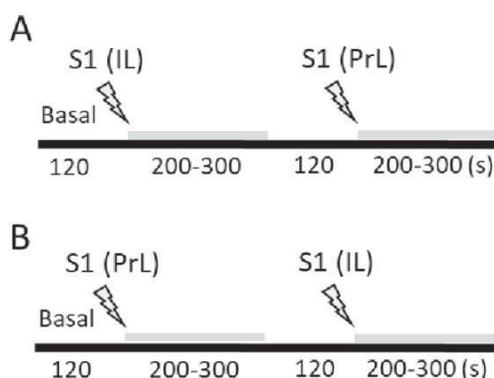
Given the different role of IL and PrL in depressive-like behaviours and in the associated changes of serotonergic function, here we examined the control exerted by IL and PrL cortices on serotonergic function in DR under the working hypothesis that each area may distinctly modulate 5-HT neuron activity, possibly via differential excitatory inputs onto 5-HT and GABA neurons within the DR.



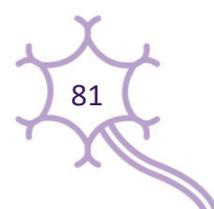
## 2. Results

### 2.1 Modulation of 5-HT neuron activity by low frequency electrical stimulation of IL and PrL

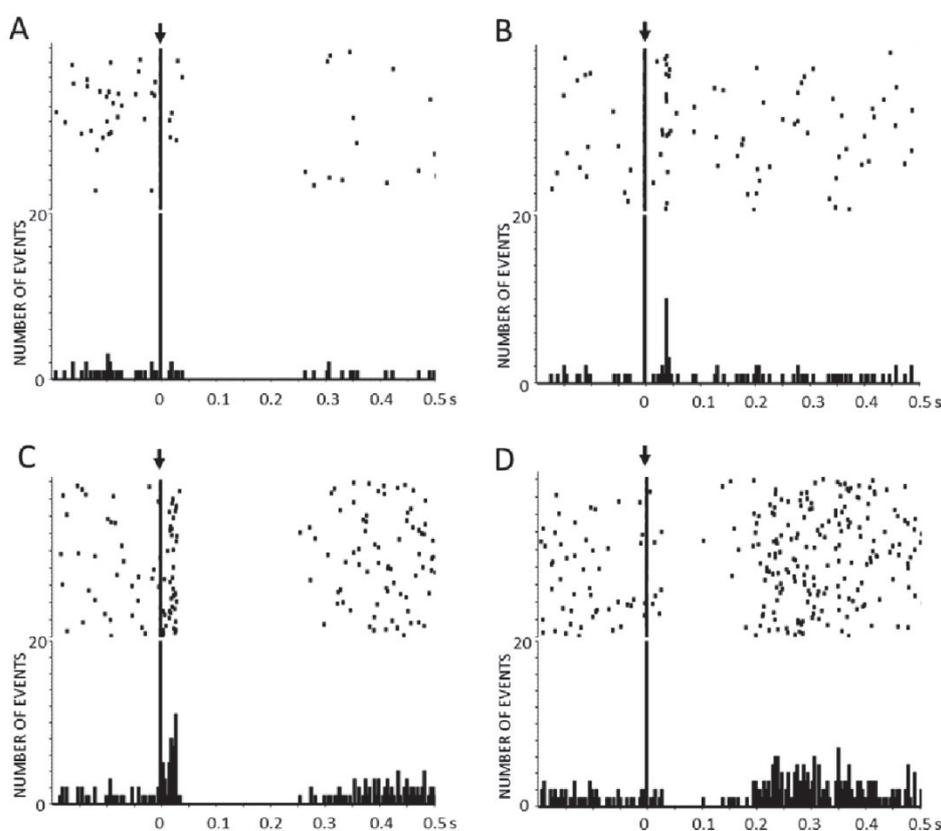
First, we examined the effect of IL and PrL electrical stimulation at a low frequency (S1; 0.9 Hz, 0.2 ms, 1.7 mA) on DR 5-HT neurons. We recorded the responses of 47 5-HT neurons to IL stimulation (first stimulation) of which 15 were subjected to a second (PrL) stimulation (**Figure 1A**, IL→PrL). Likewise, we recorded the responses of 54 neurons to PrL stimulation, of which 11 were subjected to a second (IL) stimulation (**Figure 1B**, PrL→IL). The basal firing rate of the recorded neurons was  $1.36 \pm 0.10$  and  $1.26 \pm 0.09$  spikes/s for IL (n=47) and PrL (n=54) stimulations, respectively.



**Figure 1. A) and B)** Schematic representation of the procedures used to examine the responses of DR 5-HT neurons to IL and PrL stimulation at a low frequency (S1; 0.9 Hz, 0.2 ms, 1.7 mA). Two different stimulation electrodes were placed in the IL and PrL subdivisions of the same rat (same hemisphere). After 120 s of stable recording (basal), one of the electrodes (IL or PrL) was stimulated and the response evoked in an identified 5-HT neuron was recorded for 200-300 s. After a 120 s period, we examined the response of the same 5-HT neuron to the stimulation of the electrode placed in the other subdivision (PrL or IL) using exactly the same stimulation characteristics (0.9 Hz, 0.2 ms, 1.7 mA; 200-300 s recordings).



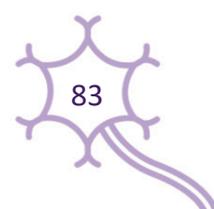
**Figure 2** shows representative examples of the different responses types evoked by IL and PrL stimulation. Most DR 5-HT neurons responded to IL or PrL stimulation (91 % to IL, 87 % to PrL), with four different types of responses: inhibitions (I) (**Figure 2A**), orthodromic activations (OA) (**Figure 2B**), (activations followed by inhibition) (OA+I) (**Figure 2C**) and inhibitions followed by activations (I+OA) (**Figure 2D**).

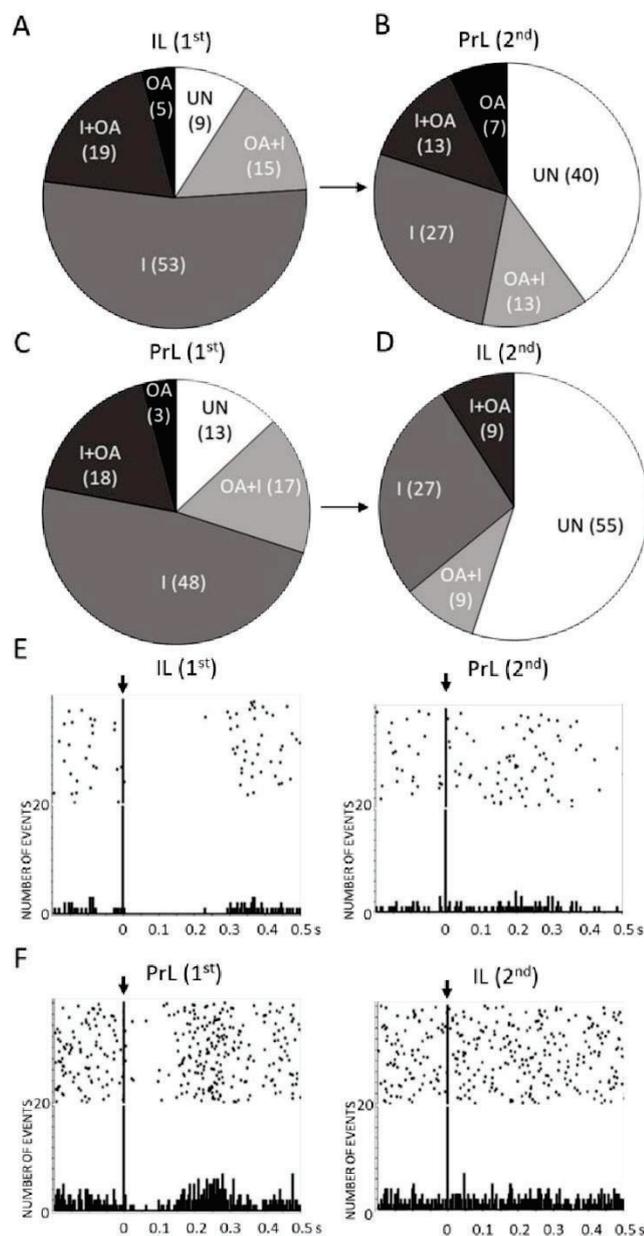


**Figure 2.** PSTH and raster plots showing representative examples of the different responses induced in DR serotonin neurons by IL and PrL stimulation at S1 (0.9 Hz, 0.2 ms, 1.7 mA). **(A)** Pure inhibitory response; **(B)** Pure orthodromic activation; **(C)** Orthodromic activations following by inhibitions (OA+I); **(D)** Inhibitions following by orthodromic activations (I+OA). Arrow mark stimulations.

Nearly half of the evoked responses were purely inhibitory (53% to IL; 48% to PrL), followed by I+OA (19% to IL; 18% to PrL), OA+I (15% to IL; 17% to PrL), and a minority of pure OA (5% to IL; 3% to PrL) (**Figure 3A** and **3C**). Chi-square test revealed no significant differences in the proportion of responses evoked in DR 5-HT neurons by IL (**Figure 3A**) or PrL (**Figure 3C**) stimulation.

However, and much to our surprise, the second stimulation site, either PrL (**Figure 3B**) or IL (**Figure 3D**)—using exactly the same stimulation protocol, as above—evoked an entirely different pattern of response. Of a total of 26 DR 5-HT neurons (15 stimulated from PrL→IL, 11 from IL→PrL), 21 neurons responded differently to the 2<sup>nd</sup> stimulation while only 5 neurons maintained the same response type. Hence, the 2<sup>nd</sup> stimulation resulted in a very large percentage of unresponsive neurons (40% of those stimulated first in IL and then in PrL; i.e., IL→PrL, and 55% of those subjected to the sequential PrL→IL stimulation). **Figure 3E-F** shows representative examples of neurons responding to the 1<sup>st</sup> but not to the 2<sup>nd</sup> stimulation, either IL→PrL or PrL→IL. Chi-square test revealed the existence of significant differences between the proportion of the different responses in IL or PrL during the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> stimulation (pie charts **Figure 3A versus 3D**,  $p < 0.0001$  and **Figure 3B versus 3C**,  $p < 0.0001$ ), together with differences between the response patterns evoked by the 2<sup>nd</sup> stimulation in IL and PrL (**Figure 3B versus 3D**,  $p < 0.01$ ).





**Figure 3.** A-D) Pie charts showing the proportions (%) of the different response types evoked in DR 5-HT neurons by IL and PrL stimulations at a low frequency (S1, 0.9 Hz). A) and B) represent the responses of 5-HT neurons first to IL (1<sup>st</sup>) and then to PrL (2<sup>nd</sup>) stimulations, whereas C) and D) show the responses of 5-HT neurons first to PrL (1<sup>st</sup>) and then to IL (2<sup>nd</sup>) stimulations. E) and F) representative PSTHs for IL→PrL (E), pure inhibition → unaffected) and for PrL→IL (F),

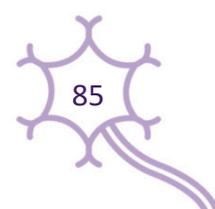
inhibition followed by activation → unaffected) driven stimulations. Note 1) the predominance of inhibitory (I) responses to both IL and PrL stimulations (53% vs 48%, respectively) (pie charts **Figure 3A** vs **Figure 3C**, Chi-square test n.s.) and that 2) the 2<sup>nd</sup> stimulation results in a very large percentage of unresponsive neurons (40% to IL; 55 to PrL) (pie charts **Figure 3A** vs **3D**, Chi-square test  $p < 0.0001$ ; **Figure 3B** vs **3C**, Chi-square test  $p < 0.0001$ ; pie charts **Figure 3B** vs **3D**, Chi-square test  $p < 0.01$ ).

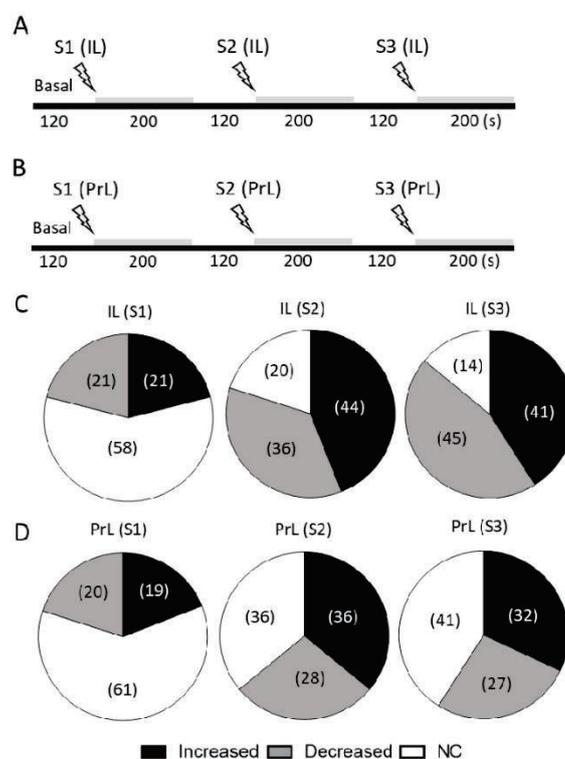
To avoid an artefactual origin of the observed differences between the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> stimulation, we examined the response of the same DR 5-HT neuron to a second stimulation from the same site using exactly the same times and experimental protocol, yet without changing the stimulation site (i.e., IL→IL, PrL→PrL;  $n=7$  in each site). All neurons examined maintained the response type during the 2<sup>nd</sup> stimulation from the same site (IL: 5 I, 1 OA+I, 1 UN; PrL: 6 I, 1 OA+I) (**Supplemental Figure S1**).

## 2.2 Modulation of 5-HT neuronal discharge by electrical stimulation of IL and PrL

Next, we examined the effect of IL or PrL stimulation at increasing frequencies on the firing rate of DR serotonergic neurons. We recorded 101 serotonergic neurons, 47 subjected to IL and 54 to PrL stimulation at the following increasing frequencies (S1: 0.9 Hz, 0.2 ms, 1.7 mA; S2: 10 Hz, 1 ms, 0.5 mA; S3: 20 Hz, 1 ms, 0.5 mA; 200 s for each stimulation, 120 s between each) (**Figure 4A** and **B**). All serotonergic cells (101) were stimulated to S1, and of them 50 were stimulated to S2 of which 44 were stimulated to S3.

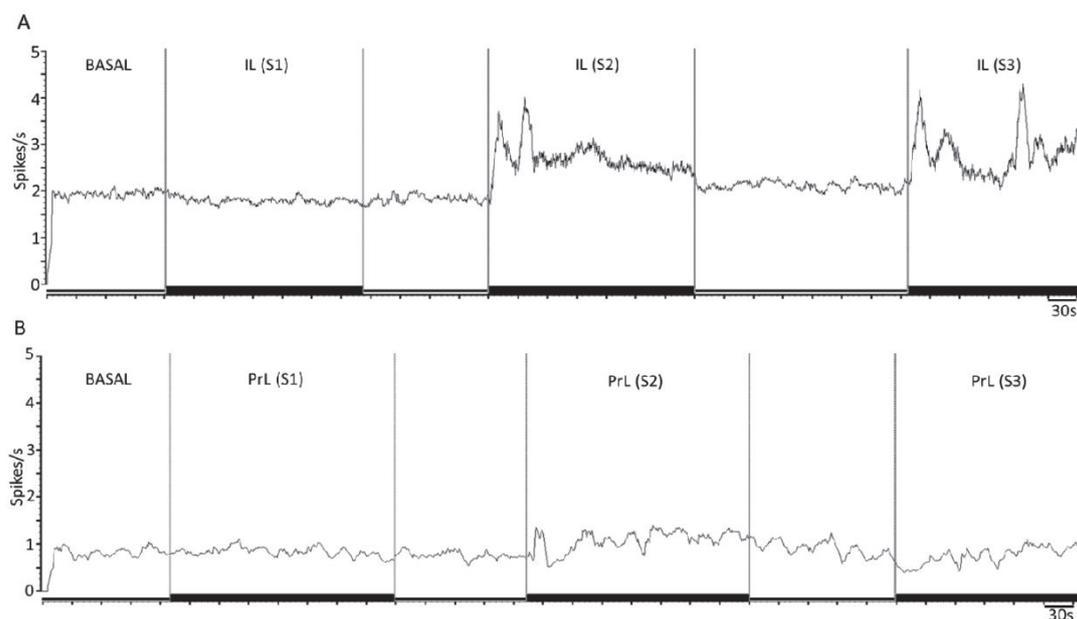
When considering the individual changes from baseline, IL or PrL stimulation at low frequency (0.9 Hz, S1) evoked similar responses in 5-HT neuronal discharge (**Figure 4C** and **D**) (Chi-square test, n.s.), as previously observed in PTSH recordings (**Figure 3A** and **3C**). However, electrical stimulation of IL and PrL at higher frequencies led to a different response pattern. Hence, the proportion of responding 5-HT neurons was greater after IL stimulation than after PrL stimulation: 80% (IL) vs. 64% (PrL) at S2 (Chi-square test IL *versus* PrL at 10 Hz,  $p < 0.05$ ) and 86% (IL) vs. 59% (PrL) at S3 (Chi-square test IL *versus* PrL at 20 Hz,  $p < 0.0001$ ) (**Figure 4C** and **D**).





**Figure 4.** **A)** and **B)** Schematic representation of the procedures used to examine the responses of DR 5-HT neurons to IL **(A)** and PrL **(B)** stimulation at increasing frequencies (S1: 0.9 Hz, 0.2 ms, 1.7 mA; S2: 10 Hz, 1 ms, 0.5 mA; S3: 20 Hz, 1 ms, 0.5 mA; 200 s for each stimulation, 120 s between each). In this case, one stimulation electrode was placed in the IL or PrL subdivisions of the same rat (same hemisphere). **C)** and **D)** Pie charts showing the proportions (%) of the different effects (increasing, decreasing and no change –NC–) evoked in DR 5-HT neurons by IL **(C)** and PrL **(D)** stimulations at S1, S2 and S3. Note 1) the similar proportion of unresponsive neurons to both IL and PrL stimulations at S1 (61% vs 58%, respectively) (pie charts IL (S1) vs PrL (S1), Chi-square test n.s.); 2) the higher percentage of responding serotonergic neurons after IL than PrL stimulation at S2 and S3 (80% vs. 64% at 10 Hz; 89% vs. 59% at 20 Hz, respectively)(Chi-square test IL (S2) vs PrL (S2),  $p < 0.05$ ); (Chi-square test IL (S3) vs PrL (S3),  $p < 0.0001$ ).

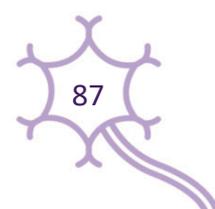
**Figure 5** shows representative recordings of DR serotonergic neurons after IL **(Figure 5AB)** or PrL **(Figure 5C)** electrical stimulation at increasing frequencies.



**Figure 5.** Mean frequency graphs showing spikes/s of representative recordings of DR 5-HT neurons during IL **(A)** and PrL **(B)** electrical stimulations at increasing frequencies (S1: 0.9 Hz, 0.2 ms, 1.7 mA; S2: 10 Hz, 1 ms, 0.5 mA; S3: 20 Hz, 1 ms, 0.5 mA; at least 200 s for each stimulation, 120 s between each). Note that IL (but not PrL) stimulations modulate the neuronal discharge of the recorded neurons **(A)** (no change→increasing→increasing for S1→S2→S3, respectively).

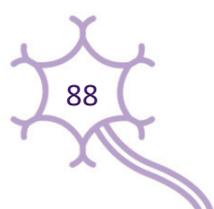
### 2.3 Pharmacological characterization of IL and PrL induced responses in DR 5-HT neurons: involvement of 5-HT<sub>1A</sub> and GABA<sub>A</sub> receptors

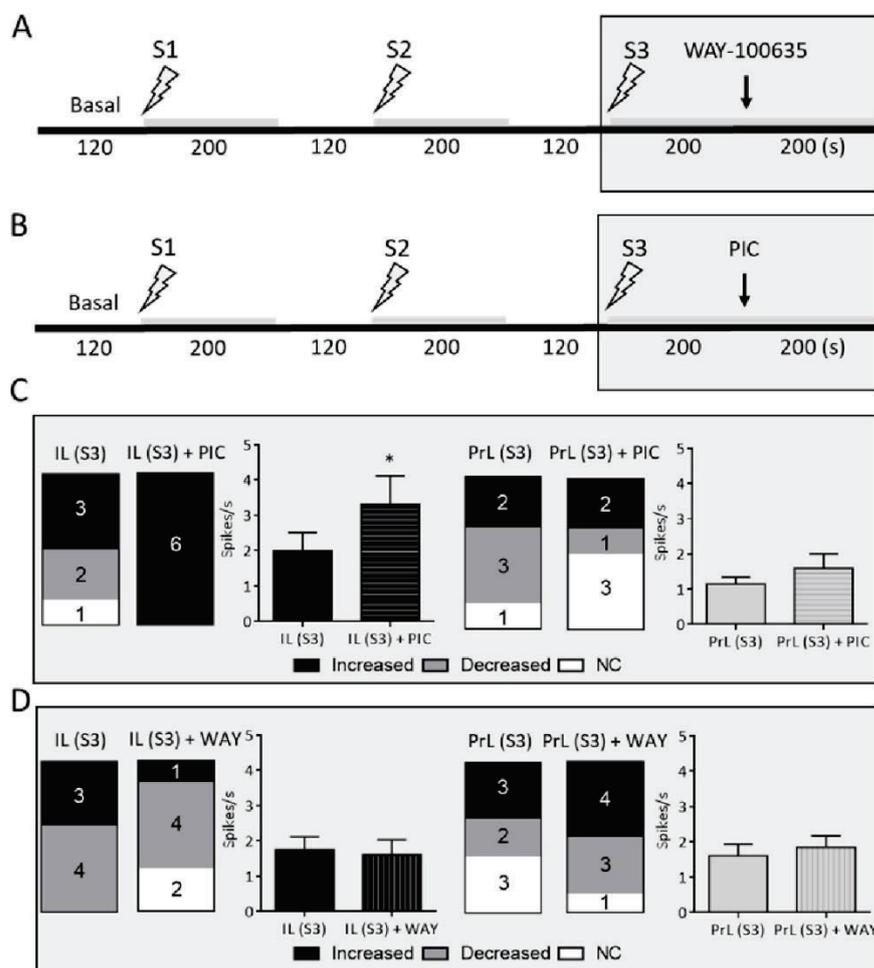
The mPFC regulates serotonergic activity in DR by direct excitatory inputs from layer V pyramidal neurons. Excitations are mediated by the activation of AMPA-R and NMDA-R on 5-HT neurons whereas inhibitions are due to (i) local negative feedback through 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors and (ii) activation of local GABA interneurons and the subsequent inhibition of 5-HT neurons via GABA<sub>A</sub>-R [7,32]. The latter mechanism also appears to involve the activation by 5-HT of 5-HT-Rs expressed in local GABA neurons, such as 5-HT<sub>1A</sub>-R [33], 5-HT<sub>2B</sub>-R [34] or 5-HT<sub>2C</sub>-R [35]. We therefore examined the involvement of 5-HT<sub>1A</sub>-R and GABA<sub>A</sub>-



R in IL- and PrL-evoked responses at 20 Hz (S3) by administering the respective antagonists WAY-100635 (10 µg/Kg) (**Figure 6A**) and picrotoxinine (PIC, 2 mg/Kg) (**Figure 6B**).

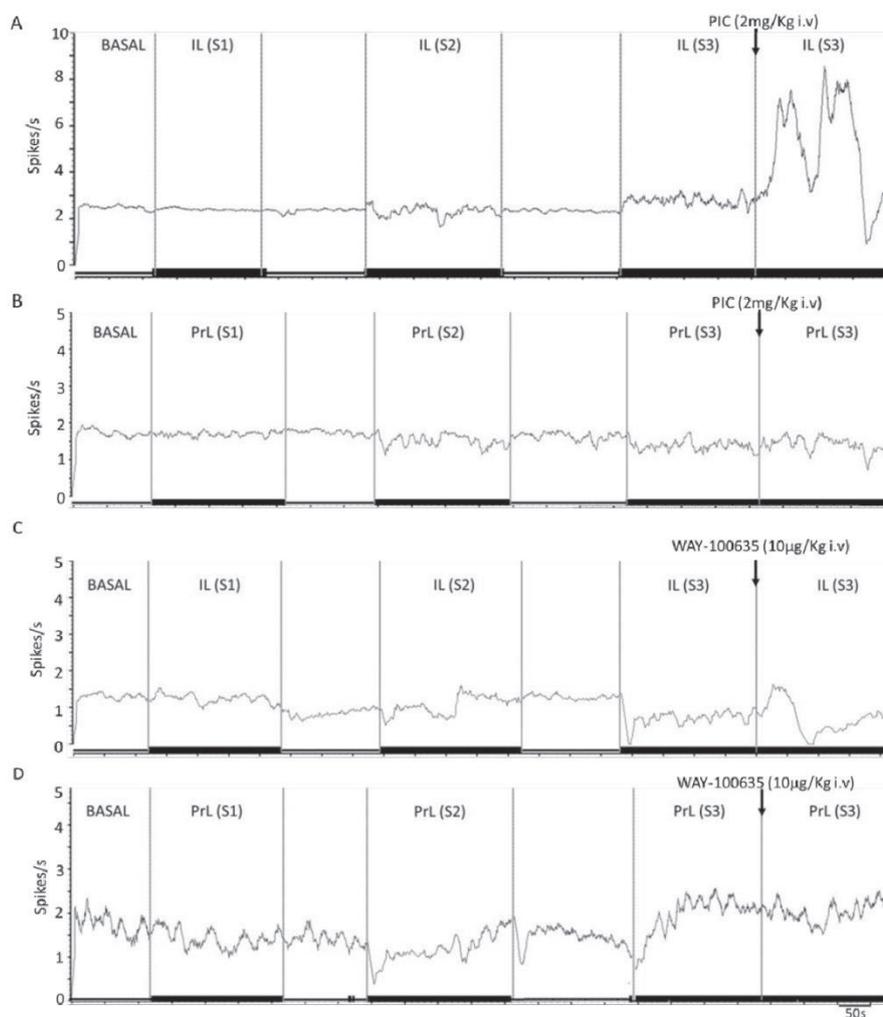
The effect of systemic WAY-100635 administration on serotonin discharge during electrical stimulation at S3 was examined in 15 rats, 8 from PrL and 7 from IL, whereas picrotoxinine was injected 12 rats, 6 stimulated from PrL and 6 from IL. **Figures 6C** and **6D** show the proportion of 5-HT neurons with increased, decreased and unaffected discharge rates before and after drug administrations. Remarkably, the GABA<sub>A</sub> receptor antagonist PIC (but not WAY-100635,) enhanced the discharge rate of all 5-HT neurons subjected to IL stimulation at S3, (from  $2.0 \pm 0.5$  to  $3.3 \pm 0.8$  spikes/s;  $p < 0.05$ ) (**Figure 6C** and **6D**). In contrast, PIC reversed the inhibitory effect of PrL stimulation at S3 in 2 units but failed to significantly increase the discharge rate (**Figure 6C**). Likewise, as also observed in IL-stimulated 5-HT neurons, WAY-100635 failed to significantly change 5-HT neuron discharge in PrL (**Figure 6D**).



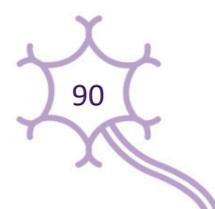


**Figure 6.** Involvement of 5-HT<sub>1A</sub> and GABA<sub>A</sub> receptors in IL and PrL induced responses in DR serotonergic neurons. **A)** and **B)** protocol used to examine the responses of DR 5-HT neurons to IL and PrL stimulation at increasing frequencies (S1: 0.9 Hz, 0.2 ms, 1.7 mA; S2: 10 Hz, 1 ms, 0.5 mA; S3: 20 Hz, 1 ms, 0.5 mA) before and during WAY-100635 (5-HT<sub>1A</sub>-R antagonist, 10 µg/Kg i.v.) **(A)** and picrotoxinine (PIC, GABA<sub>A</sub>-R antagonist, 2 mg/Kg i.v.) **(B)** administrations. Note that both drugs were injected after S3 and the stimulation was maintained for at least 200 s more, to evaluate drug effects. **C)** Picrotoxinine (PIC) and **D)** WAY-100635 effects on IL and PrL induced responses at S3. Bars show the number of increased, decreased and unaffected (NC) 5-HT neurons before and after PIC and WAY administrations during S3 stimulations. Bar graphs indicate firing rate (spikes/s) for each stimulation site (IL and PrL) and drug (PIC and WAY-100635). Note that the GABA<sub>A</sub> receptor antagonist PIC (but not WAY-100635, 5-HT<sub>1A</sub> receptor blocker) totally changed the effects on serotonergic neuron activity induced by IL stimulation at S3, increasing their firing discharge ( $p < 0.05$  vs IL (S3)).

Representative recordings of the effects of PIC and WAY-100635 in IL- and PrL-stimulated 5-HT neurons are shown in **Figure 7**.

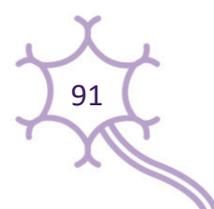


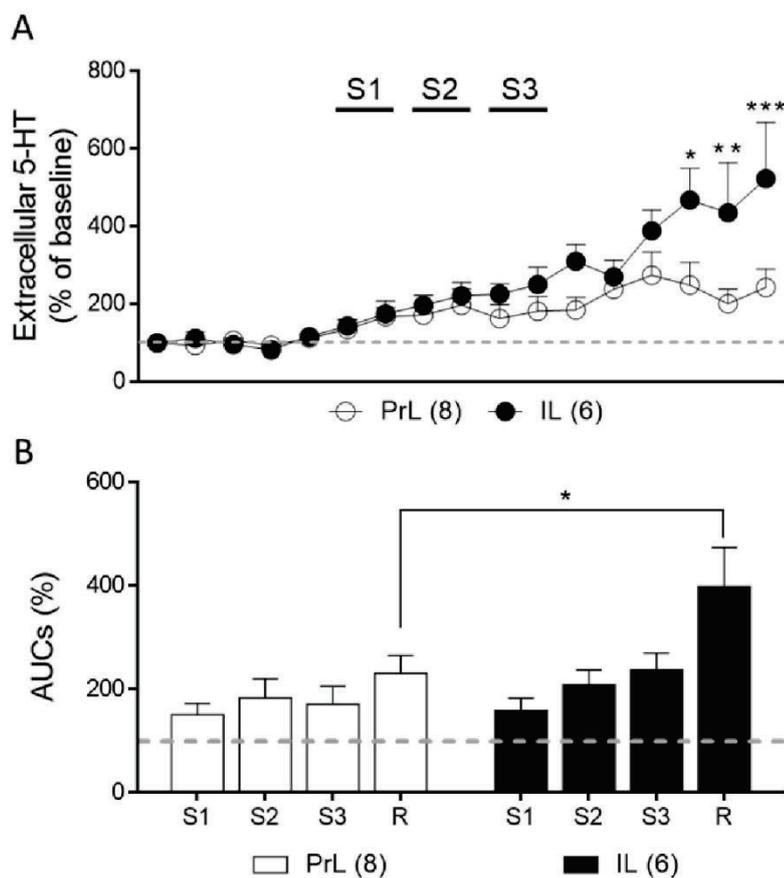
**Figure 7.** Mean frequency graphs showing spikes/s of representative recordings of DR 5-HT neurons during IL and PrL stimulations at increasing frequencies (S1: 0.9 Hz, 0.2 ms, 1.7 mA; S2: 10 Hz, 1 ms, 0.5 mA; S3: 20 Hz, 1 ms, 0.5 mA) and pharmacological effects of picrotoxinine (PIC, GABA<sub>A</sub>-R antagonist) **(A)** and **(B)** and WAY-100635 (5-HT<sub>1A</sub>-R antagonist) **(C)** and **(D)** during S3. Note that PIC (but not WAY-100635) increases serotonergic discharge during IL stimulation above values at S3 **(A)**.



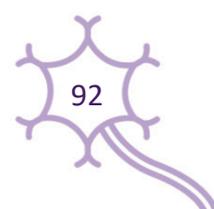
#### 2.4 Modulation of 5-HT release in DR by electrical stimulation of IL and PrL

Next, we assessed the effect of IL or PrL electrical stimulation on extracellular 5-HT concentrations in DR. This variable was used as a surrogate measure of the overall 5-HT neurons activity in the area sampled by the microdialysis probes. Anesthesia conditions and stimulation settings were the same as used in electrophysiological experiments. DR extracellular 5-HT concentrations in basal conditions were  $8.5 \pm 0.5$  fmol/fraction ( $n=14$ ). The electrical stimulation of IL enhanced 5-HT release in the DR in a frequency-dependent manner, to a maximum of  $237 \pm 32\%$  of baseline at the 20 Hz (S3), while the stimulation of PrL elevated the 5-HT release to  $183 \pm 37\%$  of baseline at the frequency 10 Hz (S2). Sixty min after the end of the stimulation, extracellular 5-HT concentrations were further enhanced to  $522 \pm 145\%$  of baseline in IL and  $242 \pm 47\%$  of baseline in PrL (**Figure 8A and B**) (Two-way ANOVA: stimulation effect:  $F(16, 92) = 13.17$ ,  $p < 0.0001$ ; area effect:  $F(1, 12) = 3.784$ , n.s.; stimulation x area interaction:  $F(16, 192) = 3.036$ ;  $p < 0.001$ ) (**Figure 8A**). Similar results were obtained when AUCs (%) for each stimulation were considered (Two-way ANOVA; stimulation effect:  $F(3, 36) = 11.67$ ,  $p < 0.0001$ ; area effect:  $F(1, 12) = 2.609$ , n.s.; stimulation x area interaction:  $F(3, 36) = 3.187$ ,  $p < 0.05$ ) (**Figure 8B**). In both cases, post-hoc differences between IL and PrL were found after ending S3 stimulation.





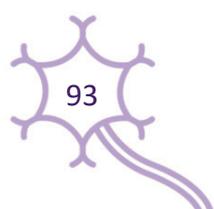
**Figure 8.** Effect of IL and PrL electrical stimulations (S1: 0.9 Hz, 0.2 ms, 1.7 mA; S2: 10 Hz, 1 ms, 0.5 mA; S3: 20 Hz, 1 ms, 0.5 mA) on extracellular 5-HT concentration in DR. **A)** Graph show data as % of basal values averaged from 6 pre-stimulation. Note that both electrical stimulations of IL and PrL enhances 5-HT release in the DR in a frequency-dependent manner. More marked effects are found 30-60-min after the end of IL stimulation. **B)** Similar results are found when data are treated as normalized areas under curve (AUC) corresponding to each stimulation (S1-S3) and recuperation (R) periods. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs PrL.

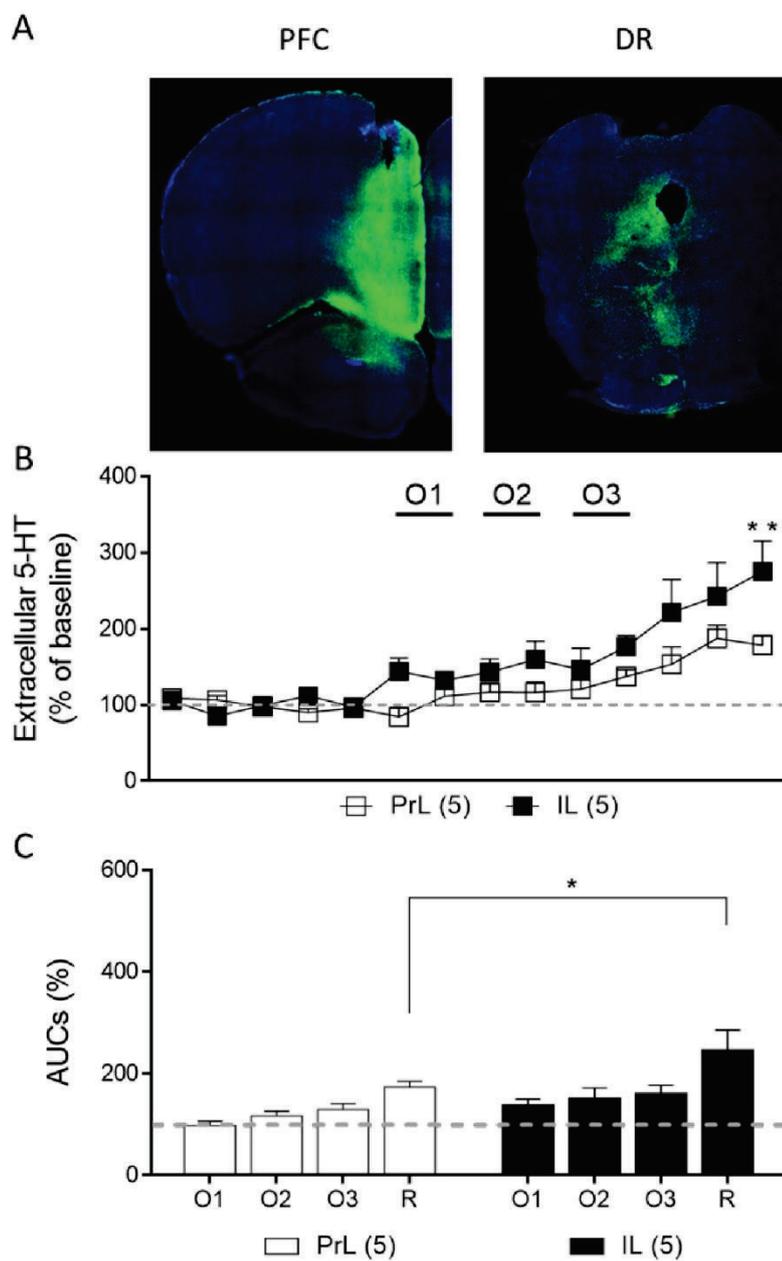


## 2.5 Modulation of 5-HT release in DR by optical stimulation of IL and PrL

**Figure 9A** shows representative coronal section of the rat brain at the level of AAV injection site (mPFC) and at probe implant site (DR). Note the intense fluorescence in DR, indicating a successful uptake and transport of AAV by mPFC-DR descending fibers.

In this set of experiments, basal 5-HT extracellular concentrations in DR were  $8.0 \pm 1.3$  fmol/fraction ( $n=10$ ). The optical stimulation of IL increased the extracellular 5-HT concentration to a maximum of  $161 \pm 16\%$  of baseline at the O3 (20 Hz) stimulation frequency, while the stimulation of PrL at the same frequency elevated 5-HT at  $129 \pm 11\%$  of baseline. Thirty min after ending the optical stimulations, extracellular 5-HT concentration in the DR was further enhanced to  $247 \pm 39\%$  of baseline in IL and to  $173 \pm 12\%$  of baseline in PrL (**Figure 9B** and **9C**) (Two-way ANOVA: stimulation effect:  $F(13, 104) = 13,53$ ,  $p < 0.0001$ ; area effect:  $F(1, 8) = 5,388$ ,  $p < 0.05$ ; stimulation x area interaction:  $F(13, 104) = 1,803$ ,  $p = 0.052$ ) (**Figure 9B**). Considering AUCs (%) for each stimulation period, significant differences were also found (Two-way ANOVA; stimulation effect:  $F(3, 24) = 14,86$ ,  $p < 0.0001$ ; area effect:  $F(1, 8) = 5,723$ ,  $p < 0.05$ ; stimulation x area interaction:  $F(3, 24) = 0,8379$ , n.s.) (**Figure 9C**). In both cases, post-hoc differences between IL and PrL 30 min after ending O3 stimulation were found.





**Figure 9.** Effect of IL and PrL optical stimulations (O1: 1 Hz, O2: 10 Hz, O3: 20 Hz, 5 ms pulse width, and ~5 mW) on extracellular 5-HT concentration in DR. **A)** Representative coronal slice of the rat brain at the level of AAV injection site (mPFC) and at the probe implant site (DR). Note the intense fluorescence in DR, indicating a successful uptake and transport of AAV by mPFC-DR descending axons. **B)** Graph show data as % of basal values averaged from 6 pre-

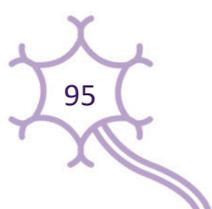
stimulation. Note that both optical stimulations of IL and PrL enhances 5-HT release in the DR in a frequency-dependent manner. More marked effects are found 30-min after the end of IL stimulation. **B)** Similar results are found when data are treated as normalized areas under curve (AUC) corresponding to each stimulation (O1-O3) and recuperation (R) periods. \*  $p < 0.05$  vs PrL.

### 3. Discussion

In the present study we investigated whether infralimbic (IL) and prelimbic (PrL) inputs to the DR may elicit differential responses in 5-HT neurons, as suggested by the distinct role of both mPFC subdivisions in emotional control (see Introduction). The study was also prompted by previous data from our lab indicating that the acute stimulation of AMPA-R in IL evoked an immediate antidepressant-like response in rats, associated to an enhancement of 5-HT release [27,28]. Remarkably, neither effect occurred after the activation of AMPA-R in PrL. Both IL and PrL electrical stimulations at low frequency (0.9 Hz) induced an overall inhibitory effect on the DR serotonergic neurons.

Regional differences were found when IL and PrL were stimulated at higher frequencies, representative of the phasic mPFC activity, with a higher percentage of responding serotonergic neurons after IL than PrL stimulation (80% vs. 64% at 10 Hz; 86% vs. 59% at 20 Hz, respectively). A smaller regional difference was noted in the percentage of 5-HT neurons inhibited by IL or PrL stimulation (45% vs. 27% at 20 Hz, respectively). The inhibitory effect due to IL stimulation at 20 Hz does not appear to be mediated by 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptor activation, as it was not reversed by WAY-100635. In contrast, it was sensitive to picrotoxinin, consistent with the involvement of local GABA<sub>A</sub>-R inputs in the control of DR 5-HT neuron activity [7,32].

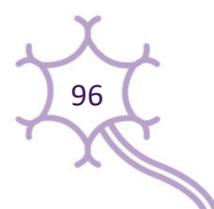
Remarkably, electrical and optical stimulation of both areas enhanced 5-HT release in DR, with a greater effect of IL *versus* PrL in controlling serotonergic activity. Similar results were obtained in a previous study from our group showing that the electrical stimulation of



the mPFC enhanced the DR 5-HT release [7]. Here we also used optogenetic techniques to provide an additional degree of selectivity in the study of the mPFC-DR pathway. Interestingly, both the electrical and optical stimulation of IL resulted in a larger increase of 5-HT release in the DR than the respective stimulation in PrL. To our knowledge, no previous study had shown a differential role of IL and PrL in the control of DR serotonergic activity. Given the specific role of IL (in rodent) and vACC (in humans) in emotional control and mood disorders, the present study thereby improves our understanding of the neural circuits underlying mood disorders.

Interestingly, a very large proportion of DR serotonergic neurons was sensitive to both stimulation sites (91% to IL, 87% to PrL), indicating that both IL and PrL are key areas in the control of serotonergic activity. This large proportion is consistent with the existence of a large number of DR-projecting layer V pyramidal neurons in both mPFC subdivisions [10], yet with distinct trajectories to the DR [9]. Previous electrophysiological evidences demonstrated that mPFC pyramidal neurons might activate or inhibit DR serotonin neurons [7]. Excitations are monosynaptic and involve the activation of AMPA and *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors on serotonin neurons [7,36], whereas inhibitions are mediated by two different mechanisms, (i) a local negative feedback recruiting 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors and (ii) the activation of GABA interneurons in the DR by mPFC inputs and the subsequent inhibition of 5-HT neurons [7,32,37,38]. Consistent with these previous studies, we found that both IL and PrL stimulation at a low, resting frequency (0.9 Hz) inhibited a similar proportion of DR 5-HT neurons (53% to IL, 48% to PrL).

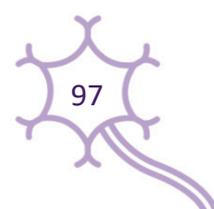
In our first set of experiments, the same 5-HT neuron was stimulated twice (IL-to-PrL and PrL-to-IL, same hemisphere) with a 2-min period between each manipulation. Surprisingly, the second stimulation (either IL or PrL) induced a completely different pattern of response, leaving almost half of the recorded neurons insensitive to the second stimulation. This differential response to the 2<sup>nd</sup> stimulation site does not appear to be an experimental artifact



since the response was maintained after a 2<sup>nd</sup> stimulation from the same site (either IL or PrL). Although we do not have a clear explanation for this observation, it may depend on the intrinsic circuitry between IL and PrL. Anatomical [39] and electrophysiological [40,41] evidence suggests a significant interaction between IL and PrL. Hence, IL and PrL exhibited reciprocal layer V/VI connectivity [42–44] and the optical activation of IL pyramidal neurons inhibited PrL pyramidal cells, indicating that IL output controls PrL output [40]. Disconnection of IL and PrL disrupted neural rhythms within the mPFC [41] and increased interregional synchrony between IL and PrL was found during fear extinction [44]. Taken together, these data suggest a complex circuit-based system within the PFC that may affect the activity of layer V neurons projecting to DR. However, the elucidation of the precise circuit mechanisms requires further research.

A key finding of our study is that IL and PrL exerted a differential control of DR serotonergic activity when stimulated at higher frequencies (10-20 Hz), representative of the phasic activity of the mPFC. As summarized above, IL stimulation at 10 and 20 Hz significantly modulated the activity of more DR 5-HT neurons than PrL stimulation at the same frequencies (80% vs. 64% at 10 Hz; 86% vs. 59% at 20 Hz, respectively).

Interestingly, the mechanisms involved in the stimulation of DR 5-HT neurons by IL and PrL appear to differ, with a more marked involvement of GABA neurons in the DR in the case of IL, as suggested by their sensitivity to the GABA<sub>A</sub>-R antagonist picrotoxinin. Hence, in addition to direct excitatory inputs onto 5-HT neurons [7], DR-projecting pyramidal neurons in IL would preferentially (compared to PrL pyramidal neurons) target GABAergic interneurons in the DR [7,32]. This view is also consistent with previous reports demonstrating how high frequency stimulation (HFS) of the rodent IL part of the PFC induced a preferential inhibitory effect on DR neurons mediated by GABA<sub>A</sub> receptors [38,45]. Likewise, intra-DR administration of GABA antagonists enhanced 5-HT cell firing and release [46,47].

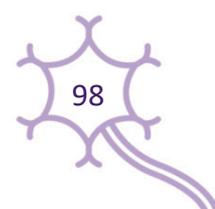


However, the 5-HT<sub>1A</sub>-R antagonist WAY-100635 was unable to augment the effect of IL and PrL stimulation on DR 5-HT activity. This result was totally unexpected, given the marked role of self-inhibitory mechanisms mediated by 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors in the control of DR 5-HT neuronal activity and 5-HT release [7,48,49]. Hence, low-frequency stimulation of mPFC inhibited a large proportion of DR 5-HT neurons via 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptor activation [7]. The present results may indicate that stimulation at higher rates would overcome self-inhibitory mechanisms mediated by 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors by increasing the excitation/inhibition ratio within the DR.

The differential role of IL and PrL in the control of DR serotonergic activity is further supported by *in vivo* microdialysis studies during electrical and optogenetic stimulation of IL and PrL. We show that the stimulation of both areas enhanced 5-HT release in DR. Remarkably, we found that viral mediated expression of ChR2 in excitatory pyramidal neurons of IL and PrL induced robust ChR2 expression in terminal fields within the DR (see **Figure 9A**). This observation confirmed the correct AAV infection site and further supports that IL and PrL are key areas in the control of serotonergic activity, with a significantly greater enhancement of DR 5-HT release after IL stimulation.

This finding adds to previous data confirming a relevant role for IL cortex in mood disorders and antidepressant treatment [15,26,28,30,50–52]. In particular, the present data agree with previous data from our laboratory showing that AMPA-R activation in IL (but not in PrL) evoked fast and robust antidepressant-like effects in rats, depending on the activation of descending excitatory pathways to the DR and the subsequent enhancement of serotonergic neurotransmission [27,28].

Noteworthy, the increase of 5-HT release in DR induced by both electrical and optogenetic stimulations persisted after cessation of the stimulation and increased over time. Although the mechanisms involved in this long term potentiation- (LTP-) like effect remain to

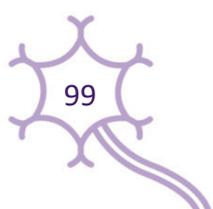


be determined, similar effects were found recording DR serotonergic neurons before, during and after IL high frequency stimulation [53]. Interestingly, Haj-Dahmane and colleagues (2017) reported on a novel mechanism for spike-timing-dependent LTP of glutamate synapses onto rat DR 5-HT neurons [54].

We found that 5-HT release in DR was greater during electrical than optical stimulation of IL and PrL. Electrical stimulation non-specifically activates multiple types of neurons near the implant site, whereas optogenetic manipulation allows direct and selective activation in a specific-cell manner. The stimulation of pyramidal neurons in IL and PrL projecting to other brain regions that project further to the DR and modulate 5-HT neurons activity (e.g., lateral hypothalamus, ventral tegmental area, locus coeruleus, etc.) [10] may partly explain the observed differences.

The main limitation of the present work is the use of only male naïve rats. Indeed, the main purpose of this study was to investigate the differential control exerted by IL and PrL on the serotonergic activity in DR, according to the major role played by IL (in rodents) and vAAC (in humans) in MDD and its treatment (see Introduction). However, the methods employed, including the use of chloral hydrate anesthetized male naïve rats, allowed a direct comparison with previous studies [7,37] examining the action of PFC stimulation on DR serotonergic activity. An extension of the present observations to female rats and rodent MDD models is highly desirable.

Despite the above limitations, the present study highlights differential roles for IL and PrL in modulating DR serotonergic activity. More marked differences are found when the stimulations are carried out at higher frequencies, representative of the phasic activity of mPFC and/or the stimulation by glutamatergic agents involved in fast antidepressant actions. Hence, IL induces a more marked modulation of DR serotonergic activity than PrL, consistent with its denser projections to DR, compared to PrL [9]. Given the key role played by 5-HT in



MDD treatment, and the key role of vACC (in humans) and IL (in rodent) in MDD and antidepressant strategies, our data might be extremely helpful to clarify the neural circuitry involved in these processes.

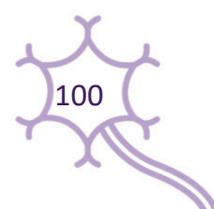
## 4. Materials and Methods

### 4.1 Animals

Male albino Wistar rats weighting 250-350 g were used (Charles River, France). Animals were kept in a controlled environment (12 h light: 12 h dark cycle and  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  room temperature), with food and water provided *ad libitum*. The experiments were conducted according to the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Animals (Scientific Procedure) Act 1986 and following the ARRIVE guideline (Kilkenny et al. 2010) during the awake phase. Animal care followed European Union regulations (directive 2010/63 of 22 September 2010) and was approved by the Institutional Animal Care and Use Committees. Stereotaxic coordinates (in mm) were chosen from bregma and skull (or brain surface) in accordance with the rat atlas of Paxinos and Watson (2005)[55]. All experiments were carried out in rats under chloral hydrate anaesthesia (induction: 400 mg/kg; maintenance: 50–70 mg/kg/h using a perfusion pump).

### 4.2 Drugs

8-OH-DPAT (5-HT<sub>1A</sub>-R agonist, 30 µg/Kg), WAY-100635 maleate (5-HT<sub>1A</sub>-R antagonist, 10 µg/Kg), Picrotoxinin (GABA<sub>A</sub>-R antagonist, 2 mg/Kg) were from Sigma/RBI (Natick, MA). 8-OH-DPAT and WAY-100635 were dissolved in saline and stored at  $-20^\circ\text{C}$  until use. Picrotoxinin was dissolved in 10% DMSO and prepared on the day of experiments. Doses are expressed as free bases and were chosen according to previous works from our lab and



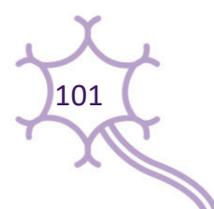
others [7,37,56]. Both compounds were injected intravenously (i.v.) through the femoral vein at the volume of 1 mL/kg.

#### 4.3 *In vivo Electrophysiology*

Single unit extracellular recordings of DR 5-HT neurons in anaesthetized rats were performed with a glass micropipette filled by as previously described [7,11]. One or two stimulation bipolar electrodes were stereotaxically implanted in each animal in IL (AP + 3.0, L -0.5, DV-5.4) and/or PrL (AP +3.5, L-0.7, DV-3.8) (DV from skull) in the same hemisphere. Serotonergic neurons from DR were recorded during descending tracks performed at the following coordinates (AP -7.6, L -2.2, DV – 5.4 to -7 from brain surface, with a lateral angle of 20°) and identified according to previously described electrophysiological criteria [7]. 5-HT neurons have a regular firing rate with low frequencies (0.3- 3 Hz; Mean  $\approx$  1.1Hz) and were inhibited by the 5-HT<sub>1A</sub>-R agonist 8-OH-DPAT (30  $\mu$ g/Kg) (**Supplemental Figure S2**). Once a spontaneously active 5-HT neuron was found, its discharge was recorded for at least 120 s (basal activity). Then, IL and/or PrL were stimulated at low frequency (S1: 0.9 Hz, 1.7 mA, 0.2 msec square pulses) during 200-300 s. In some neurons, the response to higher frequencies and lower intensity IL or PrL stimulation during 200 s was also assessed using the following settings (S2: 10 Hz, 0.5 mA, 1msec square pulses; S3: 20 Hz, 0.5 mA, 1msec square pulses). Time between stimulations was 120 s.

The involvement of 5-HT<sub>1A</sub>-R and GABA<sub>A</sub>-R in the responses induced by IL and PrL stimulation on DR 5-HT neurons was also studied. Thus, WAY-100635 or picrotoxinin were injected after 200 s of S3 stimulation and the stimulation was maintained for at least 200 more seconds.

After completion of experimental procedures, rats were euthanized by an anaesthetic overdose and brains were rapidly removed to verify the stimulation sites.



#### 4.4 *In vivo microdialysis during electrical or optical stimulation*

##### 4.4.1 *Electrical stimulation*

A first group of animals (n=14), was stereotaxically implanted with one stimulating electrode (in IL or PrL) at the same coordinates used for electrophysiological studies. Stimulation settings (S1, S2 and S3) were also as described above.

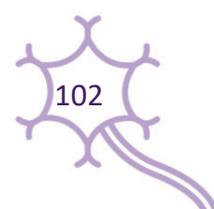
##### 4.4.2 *Adeno-associated virus (AAV) injection and optical stimulation*

A second group of rats (n=10), was injected with an adeno-associated virus (AAV) containing Channelrhodopsin (ChR2) under CaMKII promoter (AAV1-CaMKIIa-hChR2(H134H)-eYFP-WPRE.hGH; AAV-ChR2) under isoflurane anesthesia (5% induction, and 2% maintenance) four weeks before microdialysis procedures. Meloxicam (2mg/Kg s.c.) was administrated 30 min before surgery. Virus production, amplification, and purification were performed by University of Pennsylvania-Penn Vector Core (titers:  $\sim 1 \times 10^{12}$  genomic particles/mL) and a volume of 1  $\mu$ L of corresponding viral constructs was injected in the mPFC (0.5  $\mu$ L in PrL and 0.5 in IL, same coordinates as above) by a 5  $\mu$ L Hamilton syringe with a 33 gauge needle at 0.1  $\mu$ L/min. The injection needle was left for an additional 5 min period to allow diffusion of virus particles and avoid reflux.

Four weeks after AAV injection, fiber-optic cannulas (MFC\_200/240–0.22\_3.5\_ZF1.25\_FLT; Doric Lenses) were placed in IL or PrL. The blue light was delivered from 473 nm diode-pumped solid-state blue laser (Laserglow) at 1 Hz (O1), 10 Hz (O2) and 20 Hz (O3), 5 ms pulse width, and  $\sim 5$  mW (measured at the end of the patchcord) using a custom-made waveform generator (Arduino).

##### 4.4.3 *Image acquisition and analysis*

Tissue sections were imaged using an inverted Nikon Eclipse Ti2-E microscope (Nikon Instruments) attached to the spinning disk unit Andor Dragonfly 200 (Oxford Instruments).

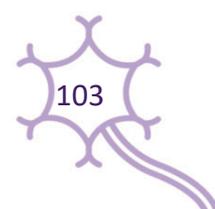


For all experiments a Plan Apochromatic 10x, numerical aperture (NA) 0.45, was used. High-precision motorized stage was used to collect the large-scale 3D mosaics of each tissue section. Individual image tiles were  $2048 \times 2048$  pixels. Samples were excited with 405 nm and 488 nm laser diodes. The beam was coupled into a multimode fiber going through the Andor Borealis unit reshaping the beam from a Gaussian profile to a homogenous flat top. From there it was passed through the  $40 \mu\text{m}$  pinhole disk. Tissue sections were imaged on a high resolution scientific complementary metal oxide semiconductor (sCMOS) camera (Zyla 4.2, 2.0 Andor, Oxford Instruments Company). Fusion software (Andor, Oxford Instruments Company) was used for acquisition and for image processing before analysis. Image stitching and deconvolution were performed using Fusion software (Andor, Oxford Instruments Company). Image analysis was performed with Image J/Fiji open source software (Wayne Rasband, NIH, USA).

#### 4.4.4 *In vivo microdialysis*

Extracellular 5-HT concentrations in DR during electrical or optical stimulation of IL or PrL were measured by *in vivo* microdialysis as previously described (Celada et al., 2001) under chloral hydrate anaesthesia. Briefly, one concentric dialysis probe (Cuprophane; 1.5 mm-long) was fixed in the DR (AP -7.6, L-2.2, DV-7.2 from skull, with a lateral angle of  $20^\circ$ ). The probe was continuously perfused with artificial cerebral spinal fluid (aCSF) at  $3.28 \mu\text{l}/\text{min}$  and 10 min fractions were collected. After six basal samples (without any stimulation), two fractions were collected during IL or PrL electrical or optical stimulation. Once the last stimulation was terminated, six or three more samples (with no stimulation) were collected for electro- or opto- microdialysis, respectively. 5-HT concentrations were analysed by high-performance liquid chromatography (HPLC) with electrochemical detection (Waters 2465) at +0.75 V with a detection limit of 1–2 fmol/sample.

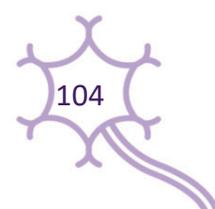
#### 4.5 *Data and Statistical Analysis*



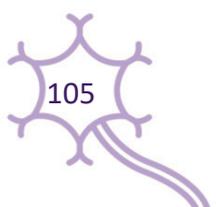
The responses in DR 5-HT neurons elicited by IL or PrL electrical stimulation at low frequencies (0.9 Hz, S1) were characterized by measuring the magnitude and duration of inhibitory and excitatory responses from peristimulus-time histograms (PSTH) (4 ms width) as previously described [7,37]. The following responses were identified: (1) Orthodromic activation (OA): orthodromic excitations elicited spikes with short and variable latencies and a post-stimulus firing rate greater than the mean pre-stimulus firing rate plus 2 times the standard deviation during at least 4 bins [7,37]. The success rate in orthodromic activations was calculated as the number of spikes during the excitation period divided by the number of triggers. (2) Inhibition: The onset of the inhibition was defined by either a total cessation of spikes for at least four successive bins (4 msec width) or a 75% decrease in the number of spikes with respect to the pre-stimulus value. The offset of the inhibition was defined as the first of four bins equal to or above the pre-stimulus value. The magnitude of the inhibition was calculated as the percentage of firing versus the pre-stimulus (200 ms) firing rate. (3) Orthodromic activation followed by inhibitory (OA+I). (4) Inhibition followed by orthodromic activation (I+OA). (5) Besides, some 5-HT neurons did not respond to IL or PrL stimulation (unaffected, UN). To compare the effects elicited by IL and PrL electrical stimulation at different frequencies on DR 5-HT neurons, firing rate (spikes/s) was also calculated before and during (3 min) electrical stimulations. 5-HT neuron activity was considered increased (or decreased) if the firing rate was  $\geq 15\%$  (or  $\leq 15\%$ ) of basal values, respectively. 5-HT extracellular concentrations in DR were expressed as fmol per fraction.

Microdialysis results are given as percentage (%) of basal values, averaged from 5 pre-stimulation samples and also as normalized areas under curve (AUC %) corresponding to every stimulation period.

Data were expressed as the mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was carried out using GraphPad Prism 6. Chi-square, Student's t-tests for dependent or independent samples



and 2-way ANOVAs (area and stimulation as factors) for repeated measures following by Bonferroni *post-hoc* test were used, as appropriate. Statistical significance has been set at the 95% confidence level (2 tailed).



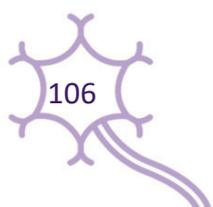
### **Author contribution**

**Elena López-Terrones:** Methodology, Software, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Veronica Paz Silva:** Methodology (Technical assistance). **Letizia Campa:** Methodology (HPLC). **Sara Conde-Berriozábal:** Metodology (Optogenetic). **Mercé Masana:** Metodology (Optogenetic). **Francesc Artigas:** Conceptualization, Writing - review & editing, Supervision, Funding. **Maurizio S. Riga:** Conceptualization, Writing - original draft, Writing - review & editing, Supervision

### **Acknowledgments**

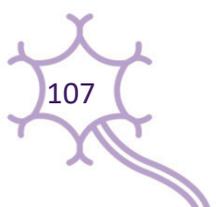
We thank Carme Casal-Moreno for skilful technical assistance with confocal microscopy. We also thank Xavier Gasull and David Soto (IDIBABS, Faculty of Medicine –UB-) for their help electrophysiology equipment.

Supported by Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (SAF2015-68346-P MINECO/FEDER, UE to F.A., PI16/00287 to P.C.; European Regional Development Fund “A way to build Europe.”; Instituto de Salud Carlos III, Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM); CERCA Programme from the Generalitat de Catalunya. The authors of this study would like to thank the support of the Secretariat d’Universitat i Recerca del Departament d’Economia i Coneixement de la Generalitat de Catalunya (2017SGR717). E.L.T. is recipient of a predoctoral contract from Spanish MINECO.



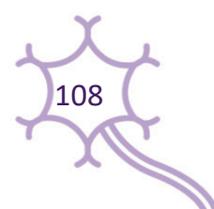
### **Conflict of Interest**

FA has received educational honoraria from Lundbeck and was PI of a grant agreement between IDIBAPS and Lundbeck. The rest of authors declare no conflict of interest.

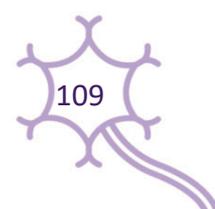


## References

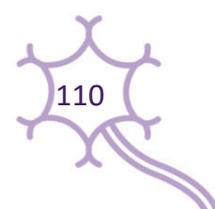
1. Roy, M.; Shohamy, D.; Wager, T.D. Ventromedial Prefrontal-Subcortical Systems and the Generation of Affective Meaning. *Trends Cogn. Sci.***2012**, *16*, 147–156, doi:10.1016/j.tics.2012.01.005.
2. Delgado, M.R.; Beer, J.S.; Fellows, L.K.; Huettel, S.A.; Platt, M.L.; Quirk, G.J.; Schiller, D. Viewpoints: Dialogues on the Functional Role of the Ventromedial Prefrontal Cortex. *Nat Neurosci***2016**, *19*, 1545–1552, doi:10.1038/nn.4438.
3. Hiser, J.; Koenigs, M. The Multifaceted Role of the Ventromedial Prefrontal Cortex in Emotion, Decision Making, Social Cognition, and Psychopathology. *Biol Psychiatry***2018**, *83*, 638–647, doi:10.1016/j.biopsych.2017.10.030.
4. Alexander, L.; Clarke, H.F.; Roberts, A.C. A Focus on the Functions of Area 25. *Brain Sci***2019**, *9*, 1–33, doi:10.3390/brainsci9060129.
5. Andrewes, D.G.; Jenkins, L.M. The Role of the Amygdala and the Ventromedial Prefrontal Cortex in Emotional Regulation: Implications for Post-Traumatic Stress Disorder. *Neuropsychol Rev***2019**, *29*, 220–243, doi:10.1007/s11065-019-09398-4.
6. Groenewegen, H.J.; Uylings, H.B.M. The Prefrontal Cortex and the Integration of Sensory, Limbic and Autonomic Information. *Prog Brain Res***2000**, *126*, 3–28, doi:10.1016/S0079-6123(00)26003-2.
7. Celada, P.; Puig, M.V.; Casanovas, J.M.; Guillazo, G.; Artigas, F. Control of Dorsal Raphe Serotonergic Neurons by the Medial Prefrontal Cortex: Involvement of Serotonin-1A, GABA<sub>A</sub>, and Glutamate Receptors. *The Journal of Neuroscience***2001**, *21*, 9917–9929.
8. Maren, S.; Quirk, G.J. Neuronal Signalling of Fear Memory. *Nat Rev Neurosci***2004**, *5*, 844–852, doi:10.1038/nrn1535.
9. Vertes, R.P. Differential Projections of the Infralimbic and Prelimbic Cortex in the Rat. *Synapse***2004**, *51*, 32–58, doi:10.1002/syn.10279.
10. Gabbott, P.L.A.; Warner, T.A.; Jays, P.R.L.; Salway, P.; Busby, S.J. Prefrontal Cortex in the Rat: Projections to Subcortical Autonomic, Motor, and Limbic Centers. *Journal of Comparative Neurology***2005**, *492*, 145–177, doi:10.1002/cne.20738.
11. Puig, M.V.; Artigas, F.; Celada, P. Modulation of the Activity of Pyramidal Neurons in Rat Prefrontal Cortex by Raphe Stimulation in Vivo: Involvement of Serotonin and GABA. *Cerebral Cortex***2005**, *15*, 1–14, doi:10.1093/cercor/bhh104.
12. Blair, R.J.R. The Amygdala and Ventromedial Prefrontal Cortex in Morality and Psychopathy. *Trends Cogn Sci***2007**, *11*, 387–392, doi:10.1016/j.tics.2007.07.003.



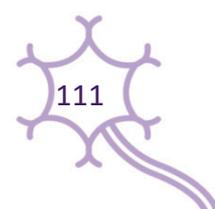
13. Sierra-Mercado, D.; Padilla-Coreano, N.; Quirck, G.J. Dissociable Roles of Prelimbic and Infralimbic Cortices, Ventral Hippocampus, and Basolateral Amygdala in the Expression and Extinction of Conditioned Fear. *Neuropsychopharmacology***2011**, *36*, 529–538.
14. Lingawi, N.W.; Laurent, V.; Westbrook, R.F.; Holmes, N.M. The Role of the Basolateral Amygdala and Infralimbic Cortex in (Re)Learning Extinction. *Psychopharmacology (Berl)***2019**, *236*, 303–312, doi:10.1007/s00213-018-4957-x.
15. López-Terrones, E.; Celada, P.; Riga, M.S.; Artigas, F. Preferential in Vivo Inhibitory Action of Serotonin in Rat Infralimbic versus Prelimbic Cortex: Relevance for Antidepressant Treatments. *Cerebral Cortex***2022**, *32*, 3000–3013, doi:10.1093/cercor/bhab396.
16. Warden, M.R.; Selimbeyoglu, A.; Mirzabekov, J.J.; Lo, M.; Thompson, K.R.; Kim, S.; Adhikari, A.; Tye, K.M.; Frank, L.M.; Deisseroth, K. A Prefrontal Cortex-Brainstem Neuronal Projection That Controls Response to Behavioural Challenge. *Nature***2012**, *492*, 428–432, doi:10.1038/nature11617.A.
17. Burgos-Robles, A.; Vidal-Gonzalez, I.; Santini, E.; Quirk, G.J. Consolidation of Fear Extinction Requires NMDA Receptor-Dependent Bursting in the Ventromedial Prefrontal Cortex. *Neuron***2007**, *53*, 871–880, doi:10.1016/j.neuron.2007.02.021.
18. Myers-schulz, B.; Koenigs, M. Functional Anatomy of Ventromedial Prefrontal Cortex: Implications for Mood and Anxiety Disorders. *Mol Psychiatry***2012**, *17*, 132–141, doi:10.1038/mp.2011.88.l.
19. Mayberg, H.S. Targeted Electrode-Based Modulation of Neural Circuits for Depression. *Journal of Clinical Investigation***2009**, *119*, 717–725, doi:10.1172/JCI38454.
20. Savitz, J.; Drevets, W.C. Bipolar and Major Depressive Disorder: Neuroimaging the Developmental-Degenerative Divide. *NeurosciBiobehav Rev***2009**, *33*, 699–771, doi:10.1016/j.neubiorev.2009.01.004.
21. Mayberg, H.S.; Lozano, A.M.; Voon, V.; McNeely, H.E.; Seminowicz, D.; Hamani, C.; Schwab, J.M.; Kennedy, S.H. Deep Brain Stimulation for Treatment-Resistant Depression. *Neuron***2005**, *45*, 651–660, doi:10.1016/j.neuron.2005.02.014.
22. Puigdemont, D.; Pérez-Egea, R.; Portella, M.J.; Molet, J.; de Diego-Adeliño, J.; Gironell, A.; Radua, J.; Gómez-Anson, B.; Rodríguez, R.; Serra, M.; et al. Deep Brain Stimulation of the Subcallosal Cingulate Gyrus: Further Evidence in Treatment-Resistant Major Depression. *International Journal of Neuropsychopharmacology***2012**, *15*, 121–133, doi:10.1017/S1461145711001088.
23. Holtzheimer, P.E.; Husain, M.M.; Lisanby, S.H.; Taylor, S.F.; Whitworth, L.A.; McClintock, S.; Slavin, K. v; Berman, J.; McKhann, G.M.; Patil, P.G.; et al. Subcallosal Cingulate Deep Brain Stimulation for Treatment-Resistant Depression: A Multisite, Randomised, Sham-Controlled Trial. *Lancet Psychiatry***2017**, *4*, 839–849, doi:10.1016/S2215-0366(17)30371-1.



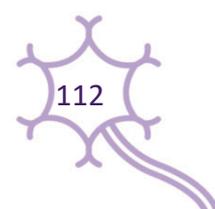
24. Morris, L.S.; Costi, S.; Tan, A.; Stern, E.R.; Charney, D.S.; Murrrough, J.W. Ketamine Normalizes Subgenual Cingulate Cortex Hyper-Activity in Depression. *Neuropsychopharmacology***2020**, *45*, 975–981, doi:10.1038/s41386-019-0591-5.
25. Heilbronner, S.R.; Rodriguez-Romaguera, J.; Quirk, G.J.; Groenewegen, H.J.; Haber, S.N. Circuit-Based Corticostriatal Homologies Between Rat and Primate. *Biol Psychiatry***2016**, *80*, 509–521, doi:10.1016/j.biopsych.2016.05.012.
26. Fuchikami, M.; Thomas, A.; Liu, R.; Wohleb, E.S.; Land, B.B.; DiLeone, R.J.; Aghajanian, G.K.; Duman, R.S. Optogenetic Stimulation of Infralimbic PFC Reproduces Ketamine’s Rapid and Sustained Antidepressant Actions. *Proc Natl Acad Sci U S A***2015**, *112*, 8106–8111, doi:10.1073/pnas.1414728112.
27. Gasull-Camós, J.; Martínez-Torres, S.; Tarrés-Gatius, M.; Ozaita, A.; Artigas, F.; Castañé, A. Serotonergic Mechanisms Involved in Antidepressant-like Responses Evoked by GLT-1 Blockade in Rat Infralimbic Cortex. *Neuropharmacology***2018**, *139*, 41–51, doi:10.1016/j.neuropharm.2018.06.029.
28. Gasull-Camós, J.; Soto-Montenegro, M.L.; Casquero-Veiga, M.; Desco, M.; Artigas, F.; Castañé, A. Differential Patterns of Subcortical Activity Evoked by Glial GLT-1 Blockade in Prelimbic and Infralimbic Cortex: Relationship to Antidepressant-like Effects in Rats. *International Journal of Neuropsychopharmacology***2017**, *20*, 988–993, doi:10.1093/ijnp/pyx067.
29. Fullana, M.N.; Ruiz-Bronchal, E.; Ferrés-Coy, A.; Juárez-Escoto, E.; Artigas, F.; Bortolozzi, A. Regionally Selective Knockdown of Astroglial Glutamate Transporters in Infralimbic Cortex Induces a Depressive Phenotype in Mice. *Glia***2019**, *67*, 1122–1137, doi:10.1002/glia.23593.
30. Fullana, M.N.; Covelo, A.; Bortolozzi, A.; Araque, A.; Artigas, F. In Vivo Knockdown of Astroglial Glutamate Transporters GLT-1 and GLAST Increases Excitatory Neurotransmission in Mouse Infralimbic Cortex: Relevance for Depressive-like Phenotypes. *Eur Neuropsychopharmacol***2019**, *29*, 1288–1294, doi:10.1016/j.euroneuro.2019.09.004. In.
31. Santana, N.; Artigas, F. Laminar and Cellular Distribution of Monoamine Receptors in Rat Medial Prefrontal Cortex. *Front Neuroanat***2017**, *11*, 87, doi:10.3389/fnana.2017.00087.
32. Varga, V.; Székely, A.D.; Csillag, A.; Sharp, T.; Hajós, M. Evidence for a Role of GABA Interneurons in the Cortical Modulation of Midbrain 5-Hydroxytryptamine Neurons. *Neuroscience***2001**, *106*, 783–792, doi:10.1016/S0306-4522(01)00294-9.
33. Sprouse, J.S.; Aghajanian, G.K. Electrophysiological Responses of Serotonergic Dorsal Raphe Neurons to 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> Agonists. *Synapse***1987**, *1*, 3–9, doi:10.1002/syn.890010103.



34. Cathala, A.; Lucas, G.; López-Terrones, E.; Revest, J.-M.; Artigas, F.; Spampinato, U. Differential Expression of Serotonin2B Receptors in GABAergic and Serotonergic Neurons of the Rat and Mouse Dorsal Raphe Nucleus. *Molecular and Cellular Neuroscience***2022**, *121*, 103750, doi:10.1016/j.mcn.2022.103750.
35. Boothman, L.; Raley, J.; Denk, F.; Hirani, E.; Sharp, T. In Vivo Evidence That 5-HT(2C) Receptors Inhibit 5-HT Neuronal Activity via a GABAergic Mechanism. *Br J Pharmacol***2006**, *149*, 861–869, doi:10.1038/sj.bjp.0706935.
36. Gartside, S.E.; Cole, A.J.; Williams, A.P.; McQuade, R.; Judge, S.J. AMPA and NMDA Receptor Regulation of Firing Activity in 5-HT Neurons of the Dorsal and Median Raphe Nuclei. *Eur J Neurosci***2007**, *25*, 3001–3008, doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05577.x.
37. Hajós, M.; Richards, C.D.; Székely, A.D.; Sharp, T. An Electrophysiological and Neuroanatomical Study of the Medial Prefrontal Cortical Projection to the Midbrain Raphe Nuclei in the Rat. *Neuroscience***1998**, *87*, 95–108, doi:10.1016/S0306-4522(98)00157-2.
38. Srejic, L.R.; Hamani, C.; Hutchison, W.D. High-Frequency Stimulation of the Medial Prefrontal Cortex Decreases Cellular Firing in the Dorsal Raphe. *European Journal of Neuroscience***2015**, *41*, 1219–1226, doi:10.1111/ejn.12856.
39. Hoover, W.B.; Vertes, R.P. Anatomical Analysis of Afferent Projections to the Medial Prefrontal Cortex in the Rat. *Brain Struct Funct***2007**, *212*, 149–179, doi:10.1007/s00429-007-0150-4.
40. Ji, G.; Neugebauer, V. Modulation of Medial Prefrontal Cortical Activity Using in Vivo Recordings and Optogenetics. *Mol Brain***2012**, *5*, 36, doi:10.1186/1756-6606-5-36.
41. van Aerde, K.I.; Heistek, T.S.; Mansvelter, H.D. Prelimbic and Infralimbic Prefrontal Cortex Interact during Fast Network Oscillations. *PLoS One***2008**, *3*, e2725, doi:10.1371/journal.pone.0002725.
42. Marek, R.; Xu, L.; Sullivan, R.K.P.; Sah, P. Excitatory Connections between the Prelimbic and Infralimbic Medial Prefrontal Cortex Show a Role for the Prelimbic Cortex in Fear Extinction. *Nat Neurosci***2018**, *21*, 654–658, doi:10.1038/s41593-018-0137-x.
43. Mukherjee, A.; Caroni, P. Infralimbic Cortex Is Required for Learning Alternatives to Prelimbic Promoted Associations through Reciprocal Connectivity. *Nat Commun***2018**, *9*, 2727, doi:10.1038/s41467-018-05318-x.
44. Watanabe, M.; Uematsu, A.; Johansen, J.P. Enhanced Synchronization between Prelimbic and Infralimbic Cortices during Fear Extinction Learning. *Mol Brain***2021**, *14*, 175, doi:10.1186/s13041-021-00884-6.
45. Srejic, L.R.; Wood, K.M.; Zegja, A.; Hashemi, P.; Hutchison, W.D. Modulation of Serotonin Dynamics in the Dorsal Raphe Nucleus via High Frequency Medial Prefrontal Cortex Stimulation. *Neurobiol Dis***2016**, *94*, 129–138, doi:10.1016/j.nbd.2016.06.009.



46. Levine, E.S.; Jacobs, B.L. Microiontophoresis and Single-Unit Recordings of Serotonergic Neurons in the Awake Cat. *J Chem Neuroanat***1992**, *5*, 335–337, doi:10.1016/0891-0618(92)90022-I.
47. Bagdy, E.; Kiraly, I.; Harsing, L.G. Reciprocal Innervation between Serotonergic and GABAergic Neurons in Raphe Nuclei of the Rat. *Neurochem Res***2000**, *25*, 1465–1473, doi:10.1023/a:1007672008297.
48. Sharp, T.; McQuade, R.; Bramwell, S.; Hjorth, S. Effect of Acute and Repeated Administration of 5-HT<sub>1A</sub> Receptor Agonists on 5-HT Release in Rat Brain in Vivo. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol***1993**, *348*, doi:10.1007/BF00171331.
49. Artigas, F.; Celada, P.; Laruelle, M.; Adell, A. How Does Pindolol Improve Antidepressant Action? *Trends Pharmacol Sci***2001**, *22*, 224–228, doi:10.1016/S0165-6147(00)01682-5.
50. Jiménez-Sánchez, L.; Castañé, A.; Pérez-Caballero, L.; Grifoll-Escoda, M.; López-Gil, X.; Campa, L.; Galofré, M.; Berrocoso, E.; Adell, A. Activation of AMPA Receptors Mediates the Antidepressant Action of Deep Brain Stimulation of the Infralimbic Prefrontal Cortex. *Cerebral Cortex***2016**, *26*, 2778–2789, doi:10.1093/cercor/bhv133.
51. Fullana, N.; Gasull-Camós, J.; Tarrés-Gatius, M.; Castañé, A.; Bortolozzi, A.; Artigas, F. Astrocyte Control of Glutamatergic Activity: Downstream Effects on Serotonergic Function and Emotional Behavior. *Neuropharmacology***2020**, *166*, doi:10.1016/j.neuropharm.2019.107914.
52. Garro-Martínez, E.; Fullana, M.N.; Florensa-Zanuy, E.; Senserrich, J.; Paz, V.; Ruiz-Bronchal, E.; Adell, A.; Castro, E.; Díaz, Á.; Pazos, Á.; et al. MTOR Knockdown in the Infralimbic Cortex Evokes a Depressive-like State in Mouse. *Int J Mol Sci***2021**, *22*, 8671, doi:10.3390/ijms22168671.
53. Lim, L.W.; Prickaerts, J.; Huguet, G.; Kadar, E.; Hartung, H.; Sharp, T.; Temel, Y. Electrical Stimulation Alleviates Depressive-like Behaviors of Rats: Investigation of Brain Targets and Potential Mechanisms. *Transl Psychiatry***2015**, *5*, e535–e535, doi:10.1038/tp.2015.24.
54. Haj-Dahmane, S.; Béique, J.C.; Shen, R.-Y. GluA2-Lacking AMPA Receptors and Nitric Oxide Signaling Gate Spike-Timing-Dependent Potentiation of Glutamate Synapses in the Dorsal Raphe Nucleus. *eNeuro***2017**, *4*, doi:10.1523/ENEURO.0116-17.2017.
55. Paxinos, G.; Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*; 5th ed.; Elsevier, 2005;
56. Allers, K.A.; Sharp, T. Neurochemical and Anatomical Identification of Fast- and Slow-Firing Neurons in the Rat Dorsal Raphe Nucleus Using Juxtacellular Labelling Methods in Vivo. *Neuroscience***2003**, *122*, 193–204, doi:10.1016/S0306-4522(03)00518-9.



## Supplemental Informations

### Differential modulation of dorsal raphe serotonergic activity in rat brain by the infralimbic and prelimbic cortices

Elena López-Terrones<sup>1,2</sup>, Verónica Paz<sup>1,2</sup>, Leticia Campa<sup>1,2</sup>, Sara Conde-Berriozábal<sup>3,4,5</sup>, Mercé Masana<sup>3,4,5</sup>, Francesc Artigas<sup>1,2,3</sup>, Maurizio S. Riga<sup>6\*</sup>

<sup>1</sup> Depart. de Neurociències i Terapèutica Experimental, Institutd'InvestigacionsBiomèdiques de Barcelona (IIBB-CSIC) 08036 Barcelona, Spain.

<sup>2</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain.

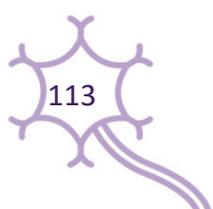
<sup>3</sup>Institutd'InvestigacionsBiomèdiques August Pi iSunyer (IDIBAPS), 08036 Barcelona, Spain.

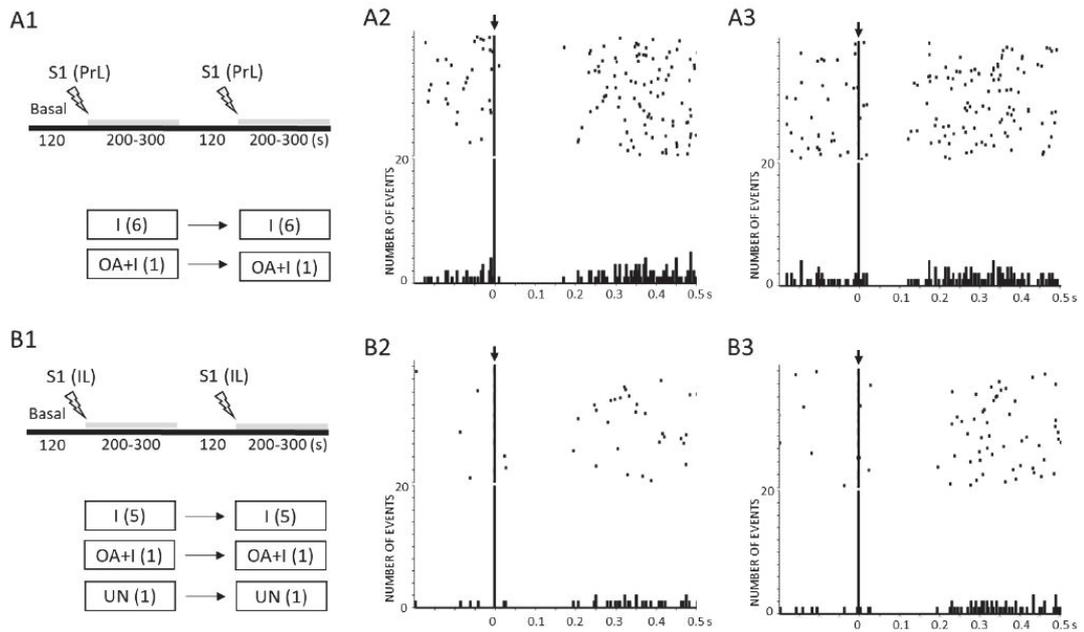
<sup>4</sup> Depart. de CiènciesBiomèdiques, Institut de Neurociències, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat de Barcelona, E-08036 Barcelona, Spain.

<sup>5</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), E-08036 Barcelona, Spain.

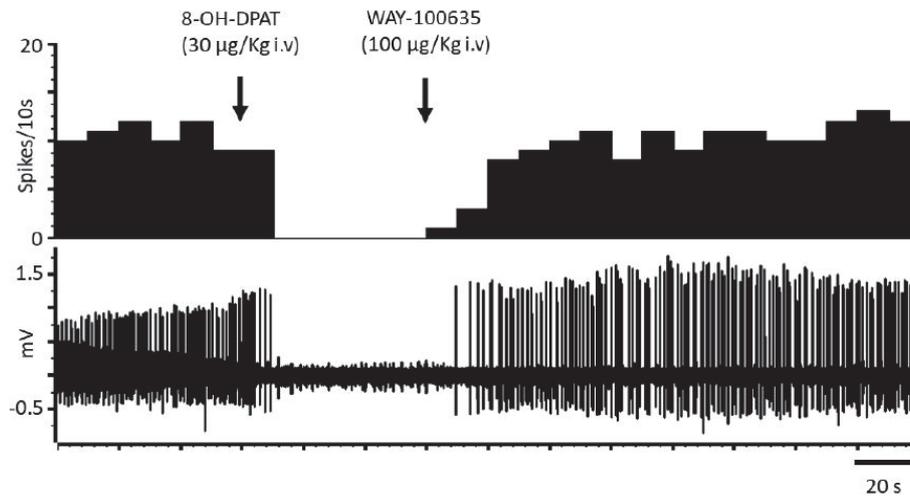
<sup>6</sup> Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER-CSIC), 41092 Sevilla, Spain.

\*Addresscorrespondenceto: Maurizio S. Riga, Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER-CSIC), Av. AmericoVespucio 24, 41092 Sevilla, Spain.Email: [mauririga@gmail.com](mailto:mauririga@gmail.com).

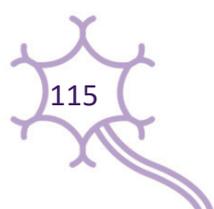




**Supplemental Figure S1.** **A1** and **B1**:Schematic representation of the protocol used for studying the response of the same dorsal raphe (DR) 5-HT neurons to a second stimulation from the same site (prelimbic, PrL; infralimbic IL) using S1 stimulation settings (0.9 Hz, 0.2 ms, 1.7 mA). Note that all neurons maintained the response type during the 2<sup>nd</sup> stimulation from the same site. Abbreviations: I (inhibitions), OA+I (orthodromic activation followed by inhibitions), UN (unaffected). **A2** and **A3** show the response of a 5-HT neuron to PrL (1<sup>st</sup>) and PrL (2<sup>nd</sup>) stimulation, respectively. **B2** and **B3** show the response of a 5-HT neuron to IL (1<sup>st</sup>) and IL (2<sup>nd</sup>) stimulation, respectively.



**Supplemental Figure S2.** Representative example of a serotonergic neuron recorded from dorsal raphe (DR) nucleus. Note its constant firing properties (around 1 Hz) in basal conditions. Pharmacological identification was also performed by administering the 5-HT<sub>1A</sub>-R agonist 8-OH-DPAT and, subsequently the 5-HT<sub>1A</sub>-R antagonist WAY-100635. As expected, 8-OH-DAP administration inhibited the firing properties of the recorded neuron and the blockade of 5-HT<sub>1A</sub>-R induced by WAY-100635 reversed the effect.





---

# Trabajo 3

---

## **Differential expression of serotonin<sub>2B</sub> receptors in GABAergic and serotonergic neurons of the rat and mouse dorsal raphe nucleus**

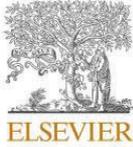
Adeline Cathala<sup>1,2</sup>, Guillaume Lucas<sup>2,3</sup>, Elena López-Terrones<sup>4,5,6</sup>, Jean-Michel Revest<sup>1,2</sup>, Francesc Artigas<sup>4,5,6</sup>, Umberto Spampinato<sup>1,2</sup>

*Molecular and Cellular Neuroscience* (2022) Jul;121:103750

doi: 10.1016/j.mcn.2022.103750.

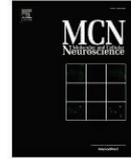
1. Inserm U1215, Neurocentre Magendie, Physiopathology and therapeutic approaches of stress-related diseases, Bordeaux F-33000, France
2. Université de Bordeaux, Bordeaux F-33000, France
3. CNRS UMR 5287, INCIA, P3TN, Bordeaux F-33000, France
4. Depart. de Neurociències i Terapèutica Experimental, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, IIBB-CSIC, Barcelona, Spain
5. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain
6. Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain





Contents lists available at ScienceDirect

## Molecular and Cellular Neuroscience

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ymcne](http://www.elsevier.com/locate/ymcne)

## Differential expression of serotonin<sub>2B</sub> receptors in GABAergic and serotonergic neurons of the rat and mouse dorsal raphe nucleus

Adeline Cathala<sup>a,b</sup>, Guillaume Lucas<sup>b,c</sup>, Elena López-Terrones<sup>d,e,f</sup>, Jean-Michel Revest<sup>a,b</sup>, Francesc Artigas<sup>d,e,f</sup>, Umberto Spampinato<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Inserm U1215, Neurocentre Magendie, Physiopathology and therapeutic approaches of stress-related diseases, Bordeaux F-33000, France

<sup>b</sup> Université de Bordeaux, Bordeaux F-33000, France

<sup>c</sup> CNRS UMR 5287, INCIA, P3TN, Bordeaux F-33000, France

<sup>d</sup> Depart. de Neurociències i Terapèutica Experimental, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, IIBB-CSIC, Barcelona, Spain

<sup>e</sup> Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

<sup>f</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

## Keywords:

5-HT<sub>2B</sub> receptor  
Dorsal raphe nucleus  
Immunohistochemistry  
Serotonin release  
Rat  
Mouse

## ABSTRACT

The central serotonin<sub>2B</sub> receptor (5-HT<sub>2B</sub>R) modulates 5-HT and dopamine (DA) neuronal function in the mammalian brain and has been suggested as a potential target for the treatment of neuropsychiatric disorders involving derangements of these monoamine systems, such as schizophrenia, cocaine abuse and dependence and major depressive disorder. Studies in rats and mice yielded contrasting results on the control of 5-HT/DA networks by 5-HT<sub>2B</sub>Rs, thereby leading to opposite views on the therapeutic potential of 5-HT<sub>2B</sub>R agents for treating the above disorders. These discrepancies may result from anatomo-functional differences related to a different cellular location of 5-HT<sub>2B</sub>Rs in rat and mouse brain. Using immunohistochemistry, we assessed this hypothesis by examining the expression of 5-HT<sub>2B</sub>Rs in 5-HT and GABAergic neurons of rats and mice within different subregions of the dorsal raphe nucleus (DRN), currently considered as the main site of action of 5-HT<sub>2B</sub> agents. Likewise, using *in vivo* microdialysis, we examined their functional relevance in the control of DRN 5-HT outflow, a surrogate index of 5-HT neuronal activity.

In the DRN of both species, 5-HT<sub>2B</sub>Rs are expressed in 5-HT cells expressing tryptophan hydroxylase 2 (TPH<sub>2</sub>), in GABAergic cells expressing glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67), and in cells expressing both markers (GAD67 & TPH<sub>2</sub>; i.e., GABA-expressing 5-HT neurons). The proportion of 5-HT<sub>2B</sub>R-positive cells expressing only TPH<sub>2</sub> was significantly larger in mouse than in rat DRN, whereas the opposite holds true for the expression in cells expressing GAD67 & TPH<sub>2</sub>. No major species differences were found in the dorsal and ventral subregions. In contrast, the lateral subregion exhibited large differences, with a predominant expression of 5-HT<sub>2B</sub>Rs in TPH<sub>2</sub>-positive cells in mice (67.2 vs 19.9 % in rats), associated with a lower expression in GAD67 & TPH<sub>2</sub> cells (7.9 % in mice vs 41.5 % in rats). Intra-DRN (0.1 μM) administration of the preferential 5-HT<sub>2B</sub>R agonist BW 723C86 decreased and increased DRN 5-HT outflow in rats and mice respectively, both effects being prevented by the intra-DRN perfusion of the selective 5-HT<sub>2B</sub>R antagonist RS 127445 (0.1 μM).

Altogether, these results show the existence of anatomical differences in the cellular expression of 5-HT<sub>2B</sub>Rs in the rat and mouse DRN, which translate into an opposite control of 5-HT outflow. Also, they highlight the relevance of the subset of GAD67-positive 5-HT neurons as a key factor responsible for the functional differences between rats and mice in terms of 5-HT neuronal activity modulation.

## 1. Introduction

The central serotonergic<sub>2B</sub> receptor (5-HT<sub>2B</sub>R) is now well-

established as a modulator of serotonin (5-HT) and dopamine (DA) neuronal function in the mammalian brain (Cathala et al., 2019; Devroye et al., 2017, 2018; Maroteaux et al., 2017). Rat studies have shown

\* Corresponding author at: Université de Bordeaux – Neurocentre Magendie, Inserm U1215, 146 rue Léo Saignat, 33077 Bordeaux Cedex, France.

E-mail addresses: [adeline.cathala@inserm.fr](mailto:adeline.cathala@inserm.fr) (A. Cathala), [guillaume.lucas@inserm.fr](mailto:guillaume.lucas@inserm.fr) (G. Lucas), [elena.lopez@iibb.csic.es](mailto:elena.lopez@iibb.csic.es) (E. López-Terrones), [jean-michel.revest@inserm.fr](mailto:jean-michel.revest@inserm.fr) (J.-M. Revest), [francesc.artigas@iibb.csic.es](mailto:francesc.artigas@iibb.csic.es) (F. Artigas), [umberto.spampinato@inserm.fr](mailto:umberto.spampinato@inserm.fr) (U. Spampinato).

<https://doi.org/10.1016/j.mcn.2022.103750>

Received 4 April 2022; Received in revised form 16 May 2022; Accepted 6 June 2022

Available online 10 June 2022

1044-7431/© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

that 5-HT<sub>2B</sub>Rs are located on GABAergic neurons in the dorsal raphe nucleus (DRN), and exert an indirect GABA-mediated tonic inhibitory control of 5-HT neurons innervating the medial prefrontal cortex (mPFC) (Cathala et al., 2019). The functional interplay between DRN 5-HT<sub>2B</sub>Rs and mPFC 5-HT<sub>1A</sub>Rs is responsible for a tonic inhibitory and excitatory modulation of the mesocortical and the mesoaccumbal DA pathways, respectively (Devroye et al., 2017).

An entirely different picture is shown by studies in mice, where 5-HT<sub>2B</sub>Rs are localized in DRN 5-HT neurons (Diaz et al., 2012) and exert a direct positive control on 5-HT neuron activity by regulating extracellular 5-HT levels via an interaction with the 5-HT transporter (Belmer et al., 2018; Launay et al., 2006). Furthermore, 5-HT<sub>2B</sub>Rs are located on a subset of DA neurons of the ventral tegmental area (VTA) and exert a direct modulatory control of DA neuron activity, as well as an indirect control of DA transmission in DA-innervated brain regions (Doly et al., 2017).

Not surprisingly, these studies in rats and mice led to opposite views on the therapeutic potential of 5-HT<sub>2B</sub>R agents for the treatment of neuropsychiatric disorders related to 5-HT/DA dysfunction, such as schizophrenia, major depression or cocaine abuse and dependence (Cathala et al., 2019, 2020; Devroye et al., 2017, 2018; Diaz et al., 2012; Doly et al., 2017; Hamati et al., 2020; Pitychoutis et al., 2015). As discussed elsewhere (Devroye et al., 2018), these discrepancies could be partly explained by the use of knockout models which, given the neurodevelopmental role of 5-HT<sub>2B</sub>Rs (Pitychoutis et al., 2015), may not reflect its physiological role but rather developmental adaptive changes triggered by the persistent deletion of the receptor. Moreover, anatomofunctional differences related to a different cellular location of 5-HT<sub>2B</sub>Rs in the rat and mouse brain may also account (Cathala et al., 2019).

In this regard, we designed the present study to assess potential species differences in the cellular location of 5-HT<sub>2B</sub>Rs within the DRN that may account for the aforementioned discrepancies. To this end, using immunohistochemistry, we examined the expression of 5-HT<sub>2B</sub>Rs in 5-HT and GABAergic neurons within different subregions of the DRN. GABA and 5-HT neurons were identified by using two well-known antibodies against glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67) and tryptophan hydroxylase 2 (TPH<sub>2</sub>), respectively, the phenotypical markers of these neuronal populations (Ju et al., 2020; Kuhn et al., 2011; Ling et al., 2005; Murphy et al., 2008; Varea et al., 2005). Also, using *in vivo* microdialysis, we examined their functional consequences in terms of the control of DRN 5-HT outflow, used as surrogate index of 5-HT neuronal activity.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Male and female Sprague-Dawley rats (8 weeks old; IFFA CREDO, Lyon, France) and male and female 129S2/SvPas mice (8–9 weeks old; Janvier, Le Genest Saint Isle, France) were used for immunohistochemistry experiments. Given the comparable expression of 5-HT<sub>2B</sub>Rs in DRN cells in both genders (see below), and in order to reduce potential variability of drug effects due to estrous cycle, only male rats and mice were used in microdialysis experiments. Animals, housed in collective plastic cages (4–6 animals per cages) were kept at constant room temperature (21 ± 2 °C) and relative humidity (60 %) with a 12 h light/dark cycle (dark from 20:00 h), and had free access to water and food. Animals were acclimated to the housing conditions for at least one week prior to the start of experiments. All experiments were conducted during the light phase of the light-dark cycle. Animal use procedures were approved by the local ethical committee of the University of Bordeaux (experimental protocol number A11356) and conformed to the International European Ethical Standards (2010/63/EU) and the French National Committee (décret 87/848) for the care and use of laboratory animals. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used.

### 2.2. Drugs

The following compounds were used: the 5-HT<sub>2B</sub>R antagonist RS 127445.HCl (2-amino-4-(4-fluoronaphth-1-yl)-6-isopropylpyrimidine hydrochloride), the 5-HT<sub>2B</sub>R agonist BW 723C86,  $\alpha$ -methyl-5-(2-thienylmethoxy)-1H-indole-3-ethanamine hydrochloride, purchased from R&D Systems (Abingdon, UK); the nonsteroidal anti-inflammatory drug Meloxicam (METACAM® 2 mg/ml), and the local anesthetic lidocaine (Lurocaine® 20 mg/ml) purchased from Centravet (Dinan, France). All other chemicals and reagents were the purest commercially available (VWR, Strasbourg, France; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).

### 2.3. Pharmacological treatments

RS 127445 and BW 723C86 were first dissolved in a 0.3 % Tween 80 distilled water solution to obtain a 500  $\mu$ M concentration, and then further diluted to the required concentration (0.1  $\mu$ M) with artificial cerebrospinal fluid (aCSF) just before their intra-DRN administration by reverse dialysis. Drug concentration and pretreatment administration time were chosen according to their pharmacodynamic properties (Bonhaus et al., 1999; Cussac et al., 2002) and on the basis of previous studies reporting their selectivity for the 5-HT<sub>2B</sub>R at the concentrations used (Audclair et al., 2010; Doly et al., 2008). In each experimental group, animals received either drugs or their appropriate vehicle, according to a randomized design.

### 2.4. Immunofluorescence procedures

Rats and mice were deeply anesthetized (Exagon, 200 mg/kg, Centravet) and transcardially perfused with phosphate-buffered solution (PBS) containing 4 % paraformaldehyde. Dissected brains were post-fixed with PBS with 4 % paraformaldehyde at 4 °C for 4–5 h, cryoprotected in PBS with 30 % sucrose and stored at –80 °C. Coronal sections of the DRN (30  $\mu$ m thickness) were made using a CM3050 S cryostat (Leica Biosystem, Wetzlar, Germany) and stored in PBS at 4 °C.

Triple immunolabelling of 5-HT<sub>2B</sub>R, GABA neurons (GAD67-positive) and 5-HT neurons (TPH<sub>2</sub>-positive) was performed by using a sequential immunofluorescence procedure. After washing in PBS, free-floating brain sections were incubated in blocking solution containing 5 % normal goat serum (NGS) and 0.5 % Triton X100 in PBS for 1 h at room temperature (RT). Subsequently, they were incubated with the primary antibody, rabbit polyclonal anti-5HT<sub>2B</sub>R (ASR-035, 1:250; Alomone labs, Jerusalem, Israel), diluted in blocking solution at 4 °C overnight. Sections were washed in PBS and incubated with secondary antibody, Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG (A-11011, 1:1000; ThermoFischer scientific; France) at 1:1000 in blocking solution, for 2 h at RT. Following this initial labelling, sections were fixed by incubating 15 min at RT in PBS containing 4 % paraformaldehyde. After washing with PBS, sections were simultaneously incubated with primary antibodies, mouse monoclonal anti-GAD67 (MAB5406, 1:1000; MerckMillipore, France) and rabbit polyclonal anti-TPH<sub>2</sub> (ABN60, 1:2000; MerckMillipore) diluted in blocking solution at 4 °C overnight. Thereafter, sections were washed in PBS and simultaneously incubated with the following fluorescent secondary antibodies: Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (A-11001, ThermoFischer scientific) and Alexa Fluor 633 goat anti-rabbit IgG (A-21070, ThermoFischer scientific) both diluted at 1:1000 in blocking solution, for 2 h at RT, washed and mounted on glass slides in anti-fade mounting medium with DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole; Vectashield Vibrance, H-1800, Eurobio scientific, France). The labelling of cell nuclei with DAPI helped to better determine cellular profiles and improved cell counting (see Supplementary Fig. S1).

Mouse monoclonal anti-GAD67 and rabbit polyclonal anti-TPH<sub>2</sub> primary antibodies used in this study were validated and widely used in previous publications (Ju et al., 2020; Kuhn et al., 2011; Ling et al.,

2005; Murphy et al., 2008; Varea et al., 2005). Primary antibody rabbit polyclonal anti-5HT<sub>2B</sub>R was also previously used (Akyuz et al., 2021; Chang et al., 2016) and its specificity was confirmed by a pre-absorption test according to the manufacturer information.

### 2.5. Cell counting

Confocal images were generated using a Leica SPE 1 confocal microscope equipped with four lasers (405, 488, 561, and 635 nm). Sections (n = 6 animals, 3 males and 3 females, 4 sections per animal, 24 sections for each DRN subregion) were imaged using sequential scanning, first with 10× dry objective then with 20× oil-immersed objective (2.0× zoom). Image processing was done in Fiji ImageJ (Schindelin et al., 2012) and included the use of background subtraction via the rolling ball method. Identical parameters for background subtraction were chosen for all images, which were directly compared with each other. In order to quantify cell density, regions of interest (ROI) in Z-projection images were measured in Fiji and cell number within the ROI was counted using the Stardist plugin. 5HT<sub>2B</sub>R-positive cells determined through the application of a detection threshold were counted in the respective ROI. For colocalization analysis, by using colocalization plugin only 5HT<sub>2B</sub>R-positive cells with a threshold of >10 pixels colocalizing with TPH<sub>2</sub> and/or GAD67 labelling were taken into account.

### 2.6. Microdialysis and 5-HT assay

Surgery and perfusion procedures were performed as previously described (Cathala et al., 2019, 2020) with minor modifications. For all experiments, the microdialysis probe (CMA/11, cuprophan, 240 μm outer diameter, Carnegie Medicin, Phymep, France) was 1 mm length. Stereotaxic coordinates were chosen according to the atlas of Paxinos and Watson (2005) and Paxinos and Franklin (2001) for rats and mice respectively. Rats and mice were anesthetized with 3% isoflurane, and placed in a stereotaxic frame. The microdialysis probe was implanted into the DRN (coordinates, in mm, relative to the interaural point, 20° lateral from vertical: for rats AP = 1, L = -1.5, V = 4.1; for mice AP = -0.8, L = -1.3, V = +4.1). After the surgery, the percentage of isoflurane was adjusted to 1.5% until the end of the experiment. Probes were perfused at a constant flow rate (0.5 μl/min), by means of a microperfusion pump (CMA 111, Carnegie Medicin, Phymep), with aCSF containing (in mM): 147 NaCl, 4 KCl, 2.2 CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4. Pharmacological treatments (see Section 2.3 for details) were performed 120 min after the beginning of the perfusion (stabilization period). 5-HT outflow was monitored during 120 min after the last drug injection. Dialysates were collected in a refrigerated fraction collector (MAB 85 Microbiotech, Phymep) every 20 min.

At the end of each experiment, the animal was deeply anesthetized with a pentobarbital overdose (Exagon, 200 mg/kg, Centravet), and its brain was removed and fixed in NaCl (0.9%) / paraformaldehyde solution (10%). Probe location into the DRN was determined histologically on serial coronal sections (60 μm) stained with cresyl violet, and only data obtained from animals with correctly implanted probes were included in the results. After collection, dialysate samples were immediately analyzed with a high-performance liquid chromatography apparatus (Alexys UHPLC/ECD Neurotransmitter Analyzer, Antec, The Netherlands), equipped with an autosampler (AS 110 UHPLC cool 6-PV, Antec), as previously described (Cathala et al., 2019, 2020). The mobile phase [containing (in mM) 100 phosphoric acid, 100 citric acid, 0.1 EDTA.2H<sub>2</sub>O, 1.1 octanesulfonic acid-NaCl plus 6% acetonitrile, adjusted to pH 6.0 with NaOH solution (50%)] was delivered at 0.070 ml/min flow rate with a LC 110S pump (Antec) through an Acquity UPLC BEH column (C<sub>18</sub>; 1 × 100 mm, particle size 1.7 μm; Waters, Saint-Quentin en Yvelines, France). Detection of 5-HT was carried out with an electrochemical detector (DECADE II, Antec) with a VT-03 glassy carbon electrode (Antec) set at +460 mV versus Ag/AgCl. Output signals were recorded on a computer (Clarity, Antec). Under these conditions, the

retention time for 5-HT was 4–4.5 min. and the sensitivity was 50 pM with a signal/noise ratio of 3:1. The 5-HT content in each sample was expressed as the percentage of the average baseline level calculated from the three fractions preceding the first drug administration. Data correspond to the mean ± S.E.M. of the percentage obtained in each experimental group.

### 2.7. Statistics

Statistical analysis was carried out by Statistica 8.0 for Windows (Statsoft, Maisons-Alfort, France) and GraphPad Prism 6.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Differences between males and females (Fig. 1b) were first assessed by a Shapiro-Wilk test to assess the normal distribution of the variable (p > 0.05; not significant) and then by using a one-way ANOVA with group as a main factor.

Differences between species for each labelling (Figs. 3 and 4) or for GAD67/TPH<sub>2</sub> ratio (Fig. 5) were evaluated by a one-way ANOVA using groups as the main factor when variables were normally distributed (Shapiro-Wilk test; p > 0.05, NS). If variables were not normally distributed (Shapiro-Wilk test; p < 0.05), comparisons were performed using the Mann-Whitney U test.

Chi-Square tests were performed to evaluate the differences in the distribution of co-localization percentages between 5-HT<sub>2B</sub>-positive cells and GAD67, TPH<sub>2</sub>, or GAD67 & TPH<sub>2</sub> staining in rat and mouse DRN (pie charts, Figs. 3 and 4).

The effect of RS 127445 (pretreatment) on BW 723C86 (treatment) after their intra-DRN administration on 5-HT outflow (Fig. 6) was analyzed by a multifactorial ANOVA with pretreatment and treatment as the between-subject factors, and time as the within-subject factor (including values from time -20 to time 120 min). In each microdialysis experiment, statistical differences in basal 5-HT values among groups were assessed by a one-way ANOVA using group as a main factor. Finally, in microdialysis experiments, when multifactorial ANOVA results were significant (p < 0.05), the Newman-Keuls post-hoc test was performed to allow adequate multiple comparisons between groups.

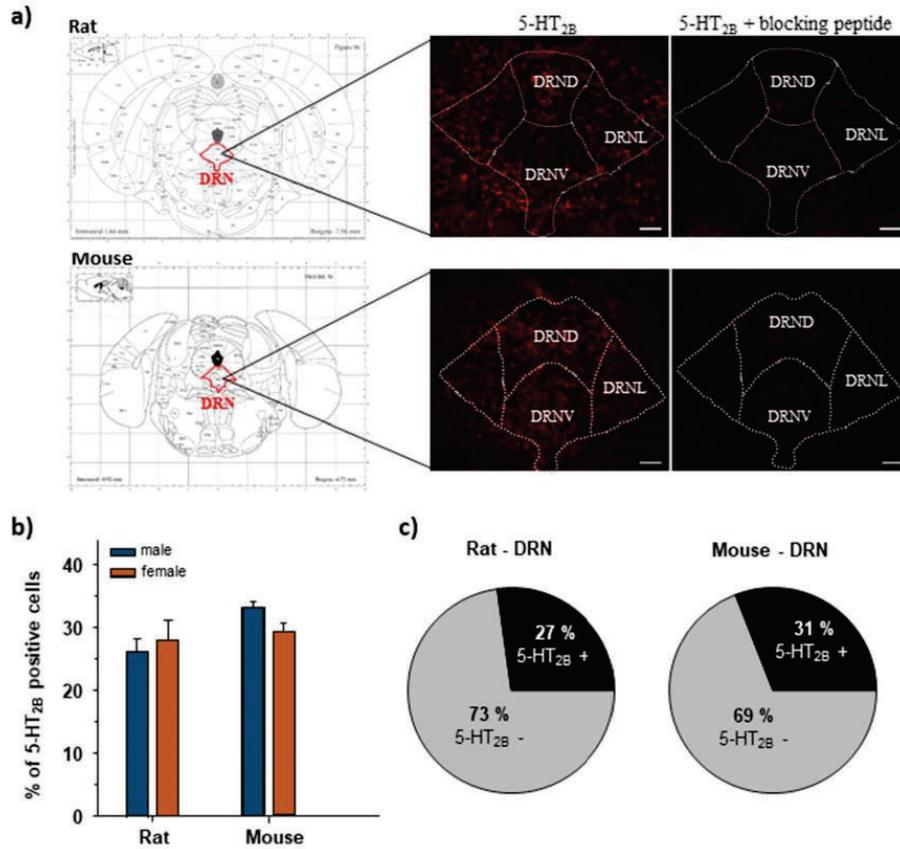
## 3. Results

### 3.1. Expression of 5-HT<sub>2B</sub>R in rat and mouse DRN

Fig. 1a shows the 5-HT<sub>2B</sub>R labelling (in red) in rat and mouse DRN and the specificity of the used antibody. Indeed, as illustrated in the right panel, 5-HT<sub>2B</sub>R labelling was abolished when the antibody was pre-incubated with the blocking peptide.

To further support its specificity, we examined the labelling by the 5-HT<sub>2B</sub>R antibody in two rat brain areas known to express (prefrontal cortex; Duxon et al., 1997) or not to express 5-HT<sub>2B</sub>R (visual cortex; Cathala et al., 2019). These cortical areas were used as positive and negative controls for 5-HT<sub>2B</sub>R labelling. As shown in Fig. S2, 5-HT<sub>2B</sub>R labelling was largely present in the PFC, and absent in the visual cortex, in agreement with the above mentioned studies (Cathala et al., 2019; Duxon et al., 1997). Despite the existence of 5-HT<sub>2B</sub>R knockout mice, these are not advisable to test the specificity of the antibody since the truncated receptor protein existing in knockout mice (Nebigil et al., 2000) contains the N-terminal region targeted by the antibody (<https://www.alomone.com/p/anti-5-hydroxytryptamine-receptor-2b-extra-cellular/ASR-035>).

Statistical analysis revealed no difference in the percentage of 5-HT<sub>2B</sub>R positives cells between male and female in both rats and mice (Fig. 1b; for rat:  $F_{\text{group}(1,4)} = 1.27$ ; NS; for mouse:  $F_{\text{group}(1,4)} = 5.36$ ; NS; ANOVA). In addition, as shown in the pie charts (Fig. 1c), there was no difference in the percentage of expression of 5-HT<sub>2B</sub>R between the two species (Fig. 1c;  $\chi^2(1) = 0.389$ ; NS; Chi-square test). These results allowed us to pool male and female animals for further immunohistochemical studies.



**Fig. 1.** Expression of serotonin<sub>2B</sub> (5-HT<sub>2B</sub>) receptors in rat and mouse dorsal raphe nucleus (DRN). (a) Schematic diagrams, taken from the Paxinos and Watson (2005) atlas of rat brain and the Paxinos and Franklin (2001) atlas of mouse brain, showing the anatomical localization of the DRN in rat and mouse brains, as used for the identification and quantification of 5-HT<sub>2B</sub> receptor. Right panels: Coronal sections at DRN level showing the localization of 5-HT<sub>2B</sub> receptor-positive cells (in red) in the different subregions of the DRN of rat and mouse, respectively. Shown is also the displacement of the immunofluorescent label by the pre-incubation of the sections with the 5-HT<sub>2B</sub> receptor blocking peptide. (b) Bar graphs showing the mean  $\pm$  SEM % of 5-HT<sub>2B</sub> receptor positive cells in the DRN of male and female rats and mice ( $n = 3$ /group) (c) Pie charts showing the percentage of cells expressing the 5-HT<sub>2B</sub> receptor in rat and mouse DRN ( $n = 6$  for rats and mice, males and females together). DRND: dorsal raphe nucleus dorsal part; DRNV: dorsal raphe nucleus ventral part, DRNL: dorsal raphe nucleus lateral part. Scale bar: 100  $\mu$ m.

### 3.2. Co-expression of 5-HT<sub>2B</sub>R with TPH<sub>2</sub> and/or, GAD67-expressing cells in rat and mouse DRN

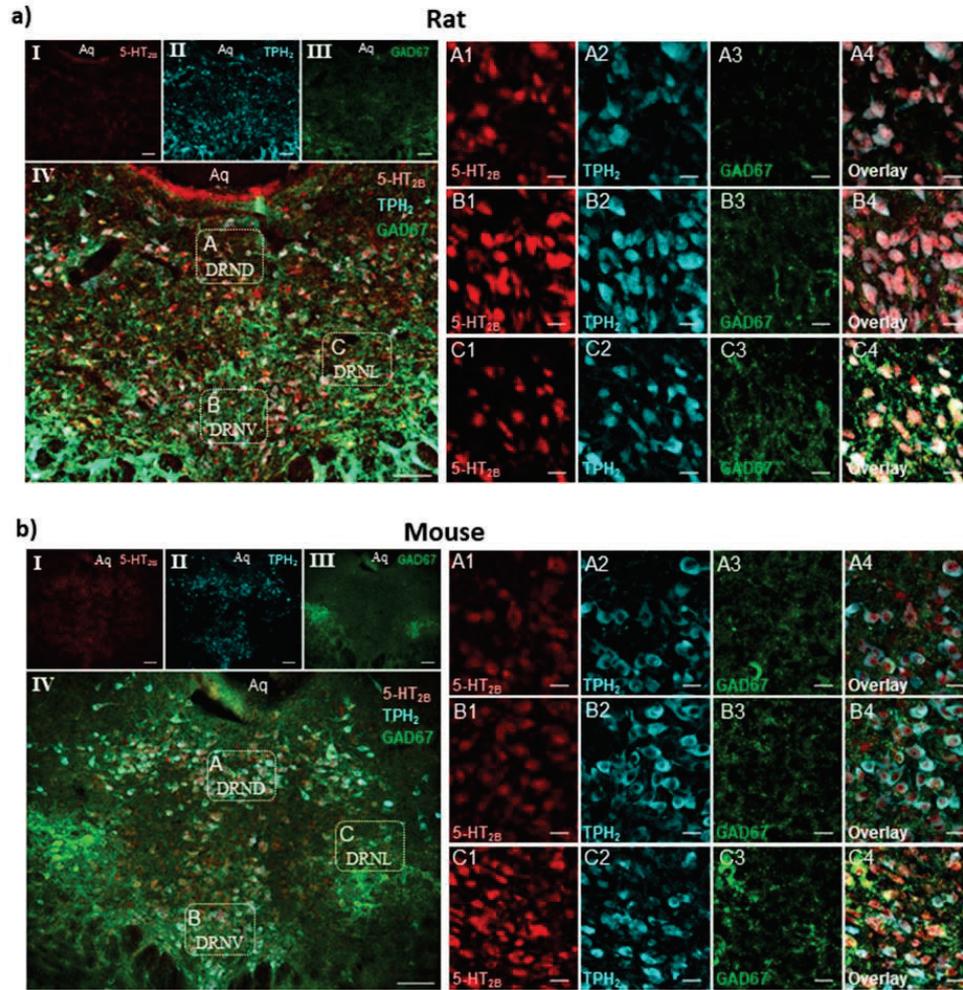
Fig. 3 illustrates the percentage of colocalization of 5-HT<sub>2B</sub>R with TPH<sub>2</sub>, GAD67 or GAD67 & TPH<sub>2</sub>-expressing cells in rat and mouse DRN. The representative individual labelling of each marker is shown in Fig. 2a and b for rats and mice respectively (panel I-IV). Statistical analysis revealed a significant difference in the percentage of co-expression of 5-HT<sub>2B</sub>R with GAD 67-positive neurons ( $p < 0.01$ ; Mann-Whitney  $U$  test), TPH<sub>2</sub>-positive neurons ( $p < 0.05$ ; Mann-Whitney  $U$  test) and GAD67 & TPH<sub>2</sub> positive neurons ( $p < 0.001$  Mann-Whitney  $U$  test) between rats and mice. No significant difference was found in the percentage of colocalization of 5-HT<sub>2B</sub>R with other cell types between two species ( $F_{\text{group}(1,34)} = 3.01$ ; NS; ANOVA). In addition, statistical analysis of pie charts revealed significant differences in the distribution of co-expression percentages between 5-HT<sub>2B</sub>R positive cells and GAD67, TPH<sub>2</sub> or GAD67 & TPH<sub>2</sub> staining in the rat and mouse DRN ( $\chi^2(3) = 15.8$ ;  $p < 0.001$ ; Chi-square test). Interestingly, the proportion of cells co-expressing 5-HT<sub>2B</sub>R and GAD67 & TPH<sub>2</sub> labelling is greater in rats than in mice (19.7 % versus 4.0 %, respectively). On the other hand,

the proportion of cells co-expressing 5-HT<sub>2B</sub>R and TPH<sub>2</sub> or GAD 67 alone is higher in mice than in rats (TPH<sub>2</sub>: 67.1 % versus 47.2 %, GAD67: 3 % versus 1.3 %, respectively).

### 3.3. Co-expression of 5-HT<sub>2B</sub>R with TPH<sub>2</sub> and/or GAD67-containing cells in rat and mouse DRN subregions

Fig. 4 shows the percentage of colocalization of 5-HT<sub>2B</sub>R with TPH<sub>2</sub>, GAD67 or GAD67 & TPH<sub>2</sub>-positive cells in rat and mouse DRN subregions. Representative individual labelling of each marker used to conduct quantitative studies is shown in Fig. 2a and 2b for rats and mice respectively, and at higher magnification in panels A1-A4 (DRND; dorsal DRN); B1-B4 (DRNV; ventral DRN) and C1-C4 (DRNL; lateral DRN).

In the DRND (Fig. 4a), statistical analysis revealed a significant difference in the percentage of co-expression of 5-HT<sub>2B</sub>R with TPH<sub>2</sub>-containing neurons ( $F_{\text{group}(1,10)} = 10.27$ ;  $p < 0.01$ ; ANOVA) and GAD67 & TPH<sub>2</sub>-positive neurons ( $F_{\text{group}(1,10)} = 37.76$ ;  $p < 0.001$ ; ANOVA) between rats and mice. However, there was no statistical difference between the two species in the percentage of colocalization of 5-HT<sub>2B</sub>R with GAD67-positive neurons ( $F_{\text{group}(1,10)} = 0.79$ ; NS; ANOVA) and



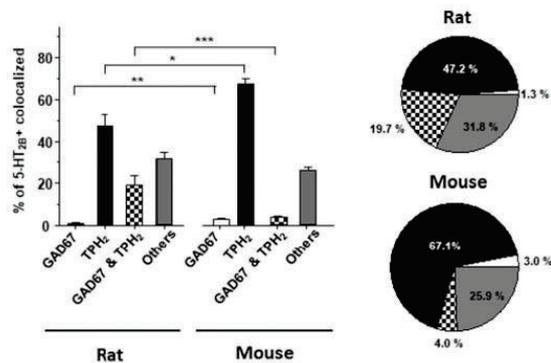
**Fig. 2.** Expression of serotonin<sub>2B</sub> (5-HT<sub>2B</sub>) receptors in tryptophan hydroxylase 2 (TPH<sub>2</sub>)- and glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67)-expressing cells in dorsal raphe nucleus (DRN) subregions of rats (a) and mice (b). Left panels are confocal images illustrating 5-HT<sub>2B</sub> receptor (I, red), TPH<sub>2</sub> (II, cyan) and GAD67 (III, green) labelling alone and their overlay (IV). Right panels show the labelling of 5-HT<sub>2B</sub> receptors (A1-C1, red), TPH<sub>2</sub> (A2-C2, cyan) and GAD67 (A3-C3, green) and their overlay (A4-C4) in the different subregions of the DRN, as shown in IV, at higher magnification: dorsal part (A1-A4, DRND), ventral part (B1-B4, DRNV) and lateral part (C1-C4, DRNL). Aq: aqueduct, scale bars: I-IV: 100  $\mu$ m; A1-A4, B1-B4 and C1-C4: 20  $\mu$ m.

other unidentified cell types ( $F_{\text{group}(1,10)} = 3.99$ ; NS; ANOVA). Statistical analysis of pie charts revealed no significant difference in the distribution of co-expression percentages between 5-HT<sub>2B</sub>R positive cells and GAD67, TPH<sub>2</sub> or GAD67 & TPH<sub>2</sub> staining in the rat and mouse DRND ( $\chi^2(3) = 6.83$ ; NS; Chi-square test).

In the DRNV (Fig. 4b), statistical analysis revealed a significant difference in the percentage of co-expression of 5-HT<sub>2B</sub>R with GAD67-containing neurons ( $F_{\text{group}(1,10)} = 19.56$ ;  $p < 0.01$ ; ANOVA) and GAD67 & TPH<sub>2</sub>-positive neurons ( $F_{\text{group}(1,10)} = 39.17$ ;  $p < 0.001$ ; ANOVA) between rats and mice. However, there was no statistical difference between the two species in the percentage of colocalization of 5-HT<sub>2B</sub>R with TPH<sub>2</sub>-positive neurons ( $F_{\text{group}(1,10)} = 0.02$ ; NS; ANOVA) and other cell types (NS, Mann-Whitney *U* test). Statistical analysis of pie charts revealed no difference in the distribution of co-expression percentages between 5-HT<sub>2B</sub>R positive cells and GAD67, TPH<sub>2</sub> or GAD67 &

TPH<sub>2</sub> staining in the rat and mouse DRNV ( $\chi^2(3) = 7.32$ ; NS; Chi-square test).

In the DRNL (Fig. 4c), statistical analysis revealed a significant difference in the percentage of co-expression of 5-HT<sub>2B</sub>R with TPH<sub>2</sub>-positive neurons ( $F_{\text{group}(1,10)} = 47.06$ ;  $p < 0.001$ ; ANOVA) and GAD67 & TPH<sub>2</sub>-positive neurons ( $p < 0.01$ ; Mann-Whitney *U* test) between rats and mice. There was no statistical difference in the percentage of colocalization of 5-HT<sub>2B</sub>R with GAD67-positive neurons ( $F_{\text{group}(1,10)} = 0.50$ ; NS; ANOVA) and other cell types between the two species ( $F_{\text{group}(1,10)} = 4.95$ ; NS; ANOVA). However, statistical analysis of pie charts revealed a significant difference in the distribution of co-expression percentages between 5-HT<sub>2B</sub>R positive cells and GAD67, TPH<sub>2</sub> or GAD67 & TPH<sub>2</sub> staining in the rat and mouse DRNL ( $\chi^2(3) = 52.09$ ;  $p < 0.0001$ ; Chi-square test). Indeed, the proportion of cells co-expressing 5-HT<sub>2B</sub>R and GAD67 & TPH<sub>2</sub> labelling is greater in rats than in mice



**Fig. 3.** Co-expression of serotonin<sub>2B</sub> (5-HT<sub>2B</sub>) receptors with tryptophan hydroxylase 2 (TPH<sub>2</sub>), glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67) or GAD67 and TPH<sub>2</sub> (GAD67 & TPH<sub>2</sub>)-expressing cells in rat and mouse dorsal raphe nucleus (DRN). Bar graphs are the mean  $\pm$  SEM % of 5-HT<sub>2B</sub> receptor positive cells expressing GAD67, TPH<sub>2</sub> or GAD67 & TPH<sub>2</sub> staining in rat and mouse DRN (n = 6). Pie charts illustrate the percentages of co-localization between 5-HT<sub>2B</sub> receptor positive cells and GAD67, TPH<sub>2</sub> or GAD67 & TPH<sub>2</sub> staining in rat and mouse DRN. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 versus the corresponding group (Mann-Whitney U test).

(41.5% versus 7.9%, respectively). On the other hand, the proportion of cells co-expressing 5-HT<sub>2B</sub>Rs and TPH<sub>2</sub> labelling alone is higher in mice than in rats (67.2% versus 19.9%, respectively).

#### 3.4. Analysis of 5-HT<sub>2B</sub>R expression in GAD67-expressing neurons (either alone or together with TPH<sub>2</sub>) vs those expressing only TPH<sub>2</sub>

Fig. 5 shows the ratio between the number of cells co-expressing 5-HT<sub>2B</sub>R and GAD67 (either alone or together with TPH<sub>2</sub>) vs the number of cells expressing only TPH<sub>2</sub>. This ratio is indicative of a preferential expression of 5-HT<sub>2B</sub>Rs in GAD67-positive cells vs TPH<sub>2</sub>-positive cells only. In the overall DRN, this ratio was significantly higher (10-fold) for rats vs mice (p < 0.01; Mann-Whitney U test). A closer analysis within the different DRN subregions revealed a significant difference between rat and mouse in the DRND (F<sub>(1,10)</sub> = 17.96, p < 0.01; ANOVA) and in the DRNL (p < 0.01; Mann-Whitney U test), the ratio reaching a much higher value in rats than in mice (200% and 1250%, respectively). No significant difference between the two species was found in the DRNV (F<sub>(1,10)</sub> = 1.57, NS; ANOVA).

#### 3.5. Effect of RS 127445 on BW 723C86-induced changes in 5-HT outflow in the rat and mouse DRN

Fig. 6 illustrates the effect of RS 127445 on BW 723C86-induced changes in 5-HT outflow in the rat and mouse DRN following their local perfusion. In rats (Fig. 6a) statistical analysis revealed a significant effect of pretreatment  $\times$  treatment interaction (F<sub>RS $\times$ BW</sub> (1,22) = 8.0, p < 0.01; F<sub>RS $\times$ BW $\times$ time</sub> (6132) = 1.81, NS; ANOVA). Post-hoc analysis revealed that BW 726C83 produced an overall significant decrease in 5-HT outflow (p < 0.01, versus the vehicle/vehicle group) reaching 26% of baseline. RS 127445, with no effect on basal 5-HT outflow (NS, versus the vehicle/vehicle group), inhibited BW 726C83-induced decrease in 5-HT outflow (p < 0.001, versus the vehicle/BW group).

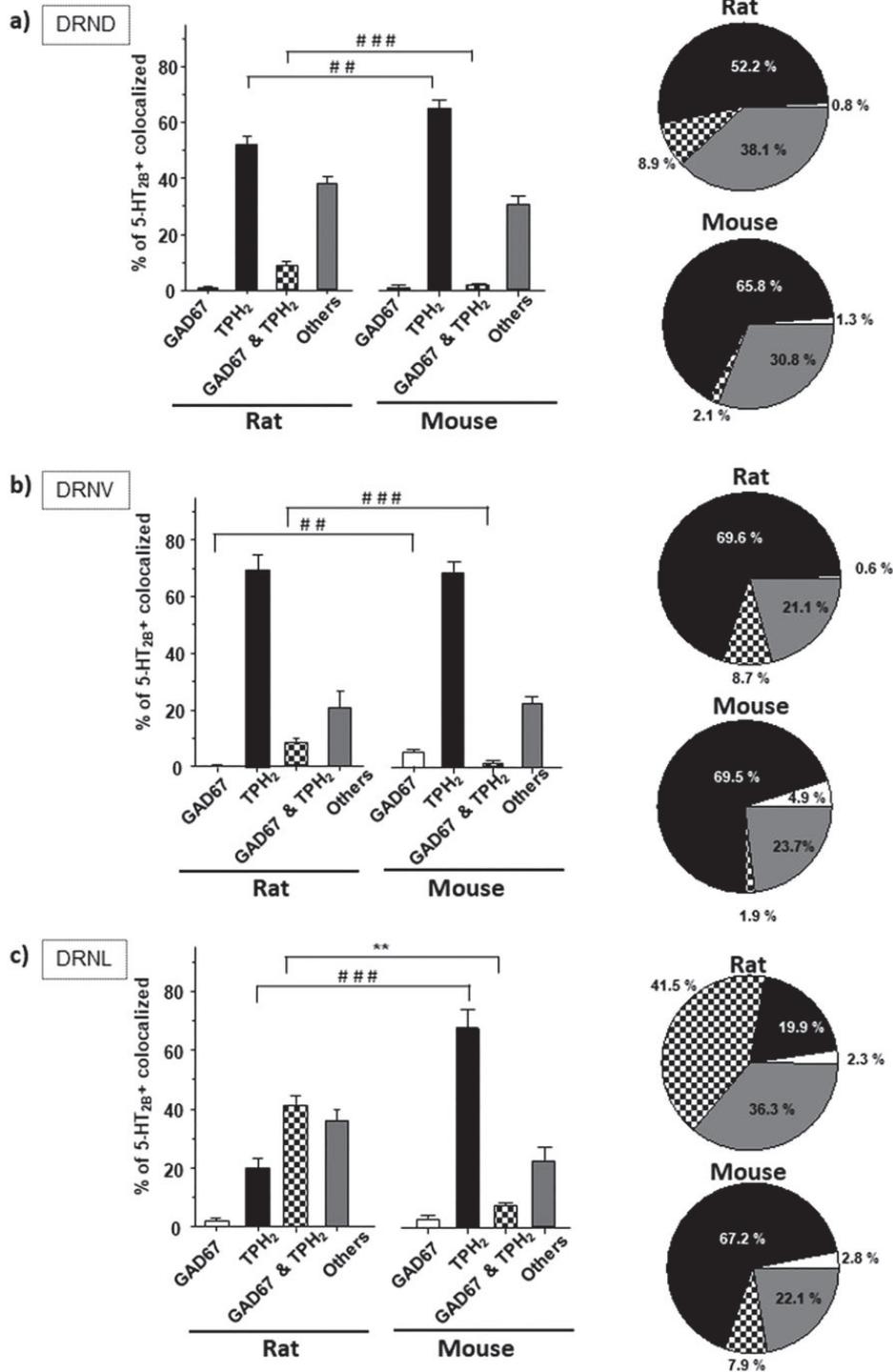
Likewise, in mouse (Fig. 6b), statistical analysis revealed a significant and time-dependent effect of pretreatment  $\times$  treatment interaction (F<sub>RS $\times$ BW</sub> (1,16) = 47.68, p < 0.001; F<sub>RS $\times$ BW $\times$ time</sub> (7112) = 10.50, p < 0.001). Post-hoc analysis revealed that, as reported previously (Doly et al., 2008), intra-DRN perfusion of BW 726C83 produced an overall significant increase in 5-HT outflow (p < 0.001, versus the vehicle/vehicle group) reaching 224% of baseline. RS 127445, with no effect on

basal 5-HT outflow (NS, versus the vehicle/vehicle group), prevented BW 726C83-induced increase in 5-HT outflow (p < 0.001, versus the vehicle/RS group).

## 4. Discussion

The present study, combining immunohistochemistry and *in vivo* microdialysis, shows for the first time the existence of 5-HT<sub>2B</sub>R anatomo-functional differences between the rat and mouse DRN, a brain region previously identified as the main site of action of 5-HT<sub>2B</sub>R agents (Devroye et al., 2017). We show that 5-HT<sub>2B</sub>Rs are expressed by a substantial percentage of 5-HT (TPH<sub>2</sub>-positive), GABAergic (GAD67-positive) neurons, as well as in neurons expressing both markers (*i.e.*, 5-HT neurons co-releasing GABA), with an overall proportion of ~30% of DRN-positive cells, similar in rats and mice (both males and females). Yet, there was a remarkable higher proportion of 5-HT<sub>2B</sub>Rs expressed in pure 5-HT neurons (TPH<sub>2</sub>-positive only) in mouse DRN, particularly in the DRNL, where 67% of TPH<sub>2</sub>-positive neurons expressed the receptor in the mouse compared to a 20% in rat DRNL. In contrast, the proportion of GAD67 & TPH<sub>2</sub>-positive neurons expressing 5-HT<sub>2B</sub>Rs was much higher in rat DRNL (41%) than in mouse DRNL (8%). Interestingly, these differences in the cellular location of 5-HT<sub>2B</sub>R are accompanied by a divergent control of 5-HT activity in rats and mice. Hence, the intra-DRN perfusion of the 5-HT<sub>2B</sub>R agonist BW 723C86 decreased and increased DRN 5-HT outflow in rats and mice, respectively, both effects being blocked by the local administration of the 5-HT<sub>2B</sub>R antagonist RS 127445. Altogether, these results reveal the existence of marked anatomical differences in the cellular expression of 5-HT<sub>2B</sub>Rs in the rat and mouse DRN (a key area for the action of 5-HT<sub>2B</sub>R agents; Devroye et al., 2017), which translate into an opposite control of DRN 5-HT outflow. Given the distinct projections of the different DRN neuronal subsets (Muzerelle et al., 2016; Okaty et al., 2019; Ren et al., 2018), the large differences in 5-HT<sub>2B</sub>R expression in DRNL between rats and mice are likely to play a role in physiological functions controlled by this neuronal subset (Muzerelle et al., 2016; Shikani et al., 2012). In particular, these results highlight the relevance of GAD67-positive 5-HT neurons in the differential modulation of 5-HT activity in rats and mice, and add important novel information on the complex regulation of DRN.

Indeed, the DRN is the major source of brain 5-HT innervation, and plays a major role in health and disease. It is a highly complex nucleus, with large neurochemical and functional diversity (Okaty et al., 2019). In addition to other neurotransmitters, such as DA, glutamate and neuropeptides, the DRN is essentially composed of 5-HT and GABA neurons, with specific input and output control patterns from and to other brain regions, respectively. Hence, 5-HT neurons are mainly innervated and controlled by inputs from cortical areas (mainly prefrontal cortex) (Celada et al., 2001; Hajós et al., 1998; Weissbourd et al., 2014) as well as by the hypothalamus, basal ganglia and midbrain (Pollak Dorocic et al., 2014). In contrast, DRN GABA neurons are mainly innervated by the central amygdala (Weissbourd et al., 2014) although cortical inputs have also been reported (Celada et al., 2001; Varga et al., 2001). Intra-DRN connectivity is mainly driven by 5-HT-5-HT and GABA-5-HT inputs (Weissbourd et al., 2014) involving inhibitory (5-HT<sub>1A</sub>R, GABA<sub>A</sub>R, GABA<sub>B</sub>R) and excitatory (5-HT<sub>2A/2B/2C</sub>R) inputs (Cathala et al., 2019; Marinelli et al., 2004). In turn, distinct projection pathways from 5-HT neurons to forebrain have also been reported (Okaty et al., 2019) sometimes depending on co-expressing genes. Hence, 5-HT neurons co-expressing vesicular glutamate transporter-3 preferentially innervate the cortex, whereas those co-expressing thyrotropin-releasing hormone innervate subcortical regions in particular the hypothalamus (Ren et al., 2019, 2018). Less is known about DRN GABA neurons, they are mainly involved in local inputs (*i.e.*, interneurons), although projection DRN GABA neurons have been identified by electrophysiological (Puig et al., 2004; López-Terrones et al., 2022) and histological methods (Bang and Commons, 2012). Moreover, GAD67-containing 5-HT neurons have been identified which may co-release 5-



(caption on next page)

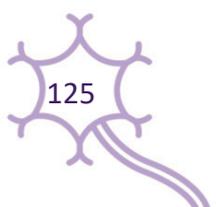


Fig. 4. Co-expression of serotonin<sub>2B</sub> receptors with tryptophan hydroxylase 2 (TPH<sub>2</sub>), glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67)- or GAD67 and TPH<sub>2</sub> (GAD67 & TPH<sub>2</sub>)-labelled cells in rat and mouse dorsal raphe nucleus (DRN) subregions. Bar charts represent the mean  $\pm$  SEM % of 5-HT<sub>2B</sub> receptor positive cells expressing GAD67, TPH<sub>2</sub> or GAD67 & TPH<sub>2</sub> staining in rat and mouse DRN subregions: (a) DRN dorsal part (DRND); (b) DRN ventral part (DRNV) and (c) DRN lateral part (DRNL) (n = 6). Pie charts illustrate the distribution of co-localization percentages between 5-HT<sub>2B</sub> receptor positive cells and GAD67, TPH<sub>2</sub> or GAD67 & TPH<sub>2</sub> staining in rat and mouse DRND (a); DRNV (b) and DRNL (c). \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 versus the corresponding group (one-way ANOVA); \*\*p < 0.01 versus the corresponding group (Mann-Whitney U test).

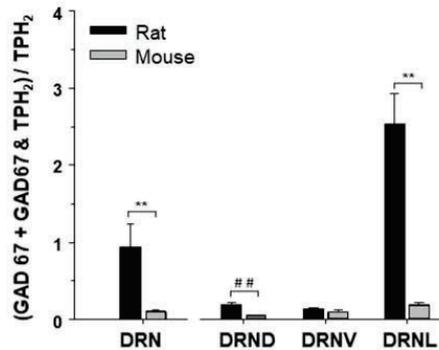


Fig. 5. Expression of serotonin<sub>2B</sub> receptors in GAD67-expressing neurons (either alone or together with TPH<sub>2</sub>) compared with those expressing only TPH<sub>2</sub> in the dorsal raphe nucleus (DRN) and its subregions. Bar charts represent the mean  $\pm$  SEM of the ratio between the number of cells co-expressing 5-HT<sub>2B</sub> receptors and GAD67 (either alone or together with TPH<sub>2</sub>) vs the number of cells expressing only TPH<sub>2</sub> in the overall DRN as well as in the dorsal, ventral and lateral subregions (DRND, DRNV and DRNL, respectively; n = 6). \*\*p < 0.01 versus the corresponding group (Mann-Whitney U test); \*\*\*p < 0.01 versus the corresponding group (one-way ANOVA).

HT and GABA (Okaty et al., 2019; Ren et al., 2019). These neurons show distinct electrophysiological properties than pure 5-HT and GABAergic neurons and appear to be preferentially localized in the DRNL (Shikanai et al., 2012).

In the first group of experiments, we studied the 5-HT<sub>2B</sub>R expression in the rat and mouse DRN by immunohistochemistry. In agreement with previous findings (Akyuz et al., 2021; Chang et al., 2016) the specificity of the 5-HT<sub>2B</sub>R labelling was confirmed by its displacement after incubation with the 5-HT<sub>2B</sub>R blocking peptide. In addition, 5-HT<sub>2B</sub>R labelling was largely present in the PFC, and absent in the visual cortex (Fig. S2), in agreement with previous studies showing that the 5-HT<sub>2B</sub>R is expressed in the PFC but not in the visual cortex (Cathala et al., 2019; Duxon et al., 1997). These results, providing negative and a positive controls of the 5-HT<sub>2B</sub>R labelling in the rat brain, add support to the specificity of the used antibody. We found that the percentage of expression of 5-HT<sub>2B</sub>R in the DRN did not differ between rats and mice as well as between males and females in both species, which allowed us to pool both genders in subsequent immunohistochemical experiments. Also, these results confirm and extend previous studies reporting the presence of 5-HT<sub>2B</sub>R mRNA in this brain structure (Bonaventure et al., 2002; Cathala et al., 2019; Diaz et al., 2012).

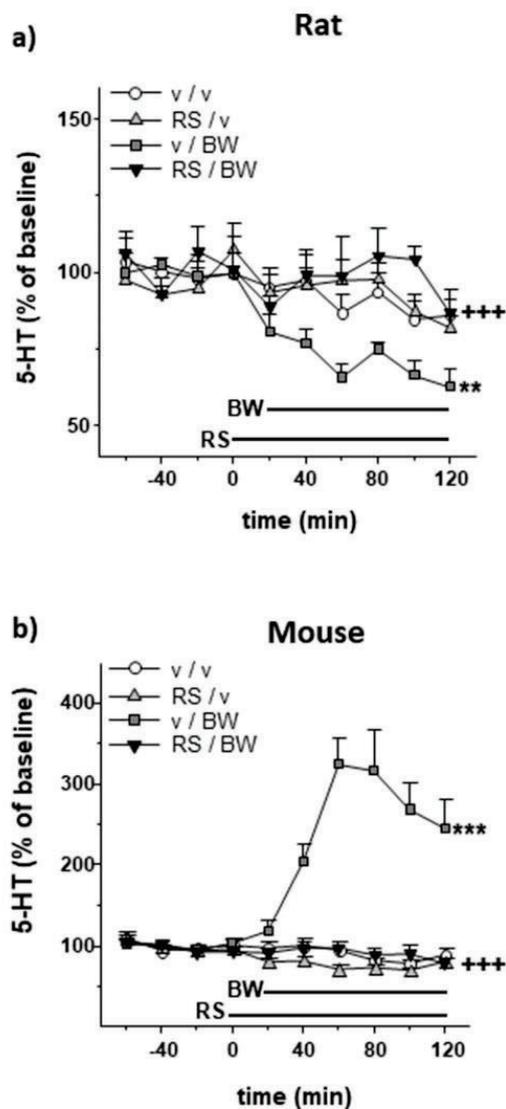
To investigate the cellular localization of 5-HT<sub>2B</sub>R in the DRN, we performed triple immunohistochemical labelling using anti-TPH<sub>2</sub> and anti-GAD67 antibodies extensively used in previous studies (Kuhn et al., 2011; Ling et al., 2005; Murphy et al., 2008; Varea et al., 2005). The labelling and the distribution of 5-HT neurons in the DRN observed in our experiments are in agreement with previous studies (Monti, 2010; Okaty et al., 2019; Ren et al., 2018). As already shown (Ju et al., 2020; Yamashiro et al., 2021), the labelling obtained with the GAD67 antibody appears to be lightly patchy. Nonetheless, this does not interfere with our method of analysis because we counted only 5HT<sub>2B</sub>R-positive cells expressing TPH<sub>2</sub> and/or GAD67 labelling with a threshold above 10

pixels. Thus, in agreement with previous findings (Bang and Commons, 2012; Weissbourd et al., 2014), we found the presence of GABAergic neurons throughout the DRN and predominantly in the lateral wings (Monti, 2010). When comparing the two species, we found that, in the whole DRN, mice display a significant higher percentage of TPH<sub>2</sub>- and GAD67 (alone)-positive cells expressing 5-HT<sub>2B</sub>R, whereas a larger population of GAD67 and TPH<sub>2</sub> (GAD67 & TPH<sub>2</sub>)-positive cells express 5-HT<sub>2B</sub>R in the rat DRN.

Subsequently, we went further into the analysis of 5-HT<sub>2B</sub>R cellular location by considering the different DRN subregions. When studying DRND and DRNV, the overall distribution of co-localization percentages between 5-HT<sub>2B</sub>R-positive cells and GAD67, TPH<sub>2</sub>, or GAD67 & TPH<sub>2</sub> staining in rat and mouse was not significantly different. However, when directly comparing the corresponding groups between rat and mice, a slight but significant difference emerged in both subregions with a higher expression of 5-HT<sub>2B</sub>R in GAD67 & TPH<sub>2</sub>-positive cells in rats. Unlike in rats, mice show more 5-HT<sub>2B</sub>R-positive cells expressing TPH<sub>2</sub> or GAD67 alone in the DRND and in the DRNV respectively. However, when considering the DRNL, we found major significant differences in the percentage distribution of 5-HT<sub>2B</sub>R located in GAD67, TPH<sub>2</sub>, or GAD67 & TPH<sub>2</sub>-positive cells. Indeed, direct comparison of cell subtype groups revealed that rats display a higher proportion of 5-HT<sub>2B</sub>R in cells expressing GAD67 & TPH<sub>2</sub> than mice. Conversely, mice show a higher proportion of 5-HT<sub>2B</sub>R in pure 5-HT cells (*i.e.*, expressing TPH<sub>2</sub> alone). This is also supported by the analysis of the ratio between the numbers of cells co-expressing 5-HT<sub>2B</sub>R and GAD67 (either alone or together with TPH<sub>2</sub>) versus the number of cells expressing TPH<sub>2</sub> only. This analysis highlights a large preferential expression of 5-HT<sub>2B</sub>R in GAD67-positive cells compared to TPH<sub>2</sub>-positive cells in the DRNL - and to a lesser extent, DRND - of rats. Altogether, these results reveal the existence of very marked anatomical differences in the cellular location of 5-HT<sub>2B</sub>R in the rat and mouse DRN, specifically in the DRNL with a predominance of 5-HT<sub>2B</sub>R on GAD67-containing TPH<sub>2</sub> cells in rats.

The presence of 5-HT<sub>2B</sub>R in TPH<sub>2</sub>-positive cell fits well with previous studies in mice showing that 5-HT<sub>2B</sub>R are localized in DRN 5-HT neurons (Diaz et al., 2012) and exert a direct positive control on 5-HT neuron activity by regulating extracellular 5-HT levels via an interaction with the 5-HT transporter (Belmer et al., 2018; Launay et al., 2006). On the other hand, the predominant presence of 5-HT<sub>2B</sub>R in GAD67-containing TPH<sub>2</sub> cells in rats suggests a relevant role of this subset of cell population in the local GABA-mediated tonic inhibitory control of 5-HT neuronal activity (Cathala et al., 2019). Indeed, as mentioned above, several studies have shown that this subpopulation of 5-HT/GAD67 neurons in the rat DRNL constitute a unique neuronal population with distinctive neurochemical and electrophysiological properties (Shikanai et al., 2012) known to play a key role in the control of 5-HT neuronal activity.

The final step of our investigations aimed at studying the functional role of 5-HT<sub>2B</sub>R on DRN 5-HT neurons in both species by assessing the effect of the local perfusion of 5-HT<sub>2B</sub>R agents on DRN 5-HT release. Likewise in our previous investigations (Cathala et al., 2019; Devroye et al., 2017), to explore the 5-HT<sub>2B</sub>R function, we used the preferential agonist BW 723C86 and the potent and selective 5-HT<sub>2B</sub>R antagonist RS 127445, two compounds which have been well-characterized *in vitro* and *in vivo* (Auclair et al., 2010; Bonhaus et al., 1999; Devroye et al., 2018). In agreement with a previous study (Doly et al., 2008), we found that BW 723C86 increased DRN 5-HT outflow in mice. Also, as already shown (Doly et al., 2008), this effect was prevented by RS 127445,



**Fig. 6.** Time course effect of RS 17445 on BW 723C86-induced changes in serotonin (5-HT) outflow in the dorsal raphe nucleus (DRN) following their intra-DRN administration in rats (a) and mice (b). RS 127445 (RS, 0.1  $\mu$ M) and BW 723C86 (BW, 0.1  $\mu$ M) were applied into the DRN by reverse dialysis for 140 min and 120 min (horizontal bars), respectively, the BW perfusion starting (time zero) 20 min after that of RS. Data are represented as the mean  $\pm$  SEM percentages of the baseline calculated from the three samples preceding the first drug administration [(a):  $n = 6$  animals/group, (b):  $n = 4-5$  animals/group]. Absolute basal levels of 5-HT in dialysates collected did not differ across the different experimental groups [(a):  $F_{(3,22)} = 2.16$ , NS; (b):  $F_{(3,16)} = 0.46$ , NS, ANOVA] and were (mean  $\pm$  SEM) for (a):  $0.14 \pm 0.01$  nM ( $n = 26$ ); for (b):  $0.14 \pm 0.01$  nM ( $n = 20$ ). \*\* $p < 0.01$  versus the corresponding v/v group and +++ $p < 0.001$  versus the corresponding v/RS group (Newman-Keuls test).

which *per se* had no effect on basal 5-HT outflow, thereby revealing the absence of 5-HT<sub>2B</sub>R-dependent tonic control on 5-HT neuron activity in the mouse DRN. On the other hand, in rats, BW 723C86 decreased DRN 5-HT outflow, this effect being blocked by a low concentration (0.1  $\mu$ M) of RS 127445, devoid of any effect on its own. Indeed, we chose this low concentration of RS 127445 on the basis of our previous experiments showing that, at higher concentration (1  $\mu$ M), it increases DRN 5-HT release, thereby revealing the existence of a 5-HT<sub>2B</sub>R-dependent tonic inhibitory control on DRN 5-HT neurons (Cathala et al., 2019; Devroye et al., 2017).

Altogether these neurochemical results, consistent with the 5-HT<sub>2B</sub>R cellular expression discussed above, are also in accordance with previous studies (Belmer et al., 2018; Cathala et al., 2019) showing that 5-HT<sub>2B</sub>Rs exert an opposite control on 5-HT outflow in rats and mice, acting in an inhibitory and an excitatory manner, respectively. Furthermore, these results are in agreement with previous studies in mice identifying the 5-HT<sub>2B</sub>R as a possible positive 5-HT autoreceptor which opposes the effects of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> negative autoreceptors in the control of 5-HT neuronal activity likely via an interaction with the 5-HT transporter (Belmer et al., 2018; Diaz et al., 2012; Launay et al., 2006).

Likewise, the present findings provide a valuable basis for a better understanding of the contrasting results issued from previous studies in rats and mice over the last decade, and leading to opposite conclusions concerning the therapeutic potential of 5-HT<sub>2B</sub>R agents. Thus, 5-HT<sub>2B</sub>R antagonists have been proposed as a new class of drugs for improved treatment of schizophrenia or depression in rats (Cathala et al., 2019; Devroye et al., 2016; Hamati et al., 2020). In contrast, genetic inactivation of 5-HT<sub>2B</sub>R in mice has been shown to induce a wide spectrum of antipsychotic-sensitive schizophrenic-like phenotypes (Pitychoutis et al., 2015), and to reduce the efficacy of antidepressant drugs (Belmer et al., 2018; Diaz et al., 2012). Of note, a similar comparative analysis of the cellular distribution of the 5-HT<sub>2B</sub>R within rat and mouse DA brain regions would allow a better understanding of the contrasting results concerning the role of this receptor in the control of DA neuronal activity (direct and/or indirect), as well as in the control of the behavioral and neurochemical responses of psychostimulants (Auclair et al., 2010; Doly et al., 2008, 2009, 2017; Devroye et al., 2015, 2018; Cathala et al., 2020).

In conclusion, the present study provides the first evidence for the existence of anatomical differences concerning the cellular expression of the 5-HT<sub>2B</sub>R in the rat and mouse DRN. It confirms and extends our previous findings in rats reporting the presence of the 5-HT<sub>2B</sub>R mRNA in DRN GABAergic cells and its participation in the control of the negative-feedback loop regulating DRN 5-HT neuron activity (Cathala et al., 2019). Specifically, the analysis of the different DRN subregions revealed that, in the rat DRNL, 5-HT<sub>2B</sub>Rs are mainly expressed in a subset of GAD67-containing 5-HT neurons, whereas, in the mouse DRNL, 5-HT<sub>2B</sub>Rs are mostly expressed in TPH<sub>2</sub>-positive cells. From a functional point of view, in agreement with its cellular localization, DRN 5-HT<sub>2B</sub>R stimulation exerts an opposite excitatory (direct) and inhibitory (indirect GABA-mediated) control of DRN 5-HT outflow in the mouse and the rat, respectively. The observed anatomo-functional differences provide a valuable basis for a better understanding of the discrepant results issued from rat and mouse studies over the last decade, as well as of their translational significance related to the therapeutic potential of 5-HT<sub>2B</sub>R agents for treating neuropsychiatric disorders related to 5-HT/DA dysfunction, such as schizophrenia, depression or drug addiction (Devroye et al., 2018; Maroteaux et al., 2017).

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2022.103750>.

#### CRediT authorship contribution statement

Adeline Cathala: Conceptualization, Data curation, Formal analysis,

Writing - original draft, Guillaume Lucas: Data curation, Formal analysis, Writing - review & editing; Elena López-Terrones: data curation, review & editing; Jean-Michel Revest: Resources. Francesc Artigas: Conceptualization, Data curation, Writing - review & editing. Umberto Spampinato: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Writing - original draft, Writing - review & editing, Supervision.

#### Declaration of competing interest

All authors declare that they have no conflict of interest.

#### Acknowledgements

This study was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and University of Bordeaux and by grant SAF2015-68346-P from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness. The authors wish to thank Pr. Guillaume Drutel for fruitful discussions during the accomplishment of this study, and Cedric Dupuy for providing excellent care to animals. Support from the Instituto de Salud Carlos III, Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM) and the Secretaria d'Universitats i Recerca del Departament d'Economia i Coneixement de la Generalitat de Catalunya (2017SGR717) is also acknowledged. The confocal analysis was done in the Bordeaux Imaging Center (BIC), a service unit of the CNRS-INSERM and Bordeaux University, member of the National Infrastructure France Biolmaging supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04).

#### References

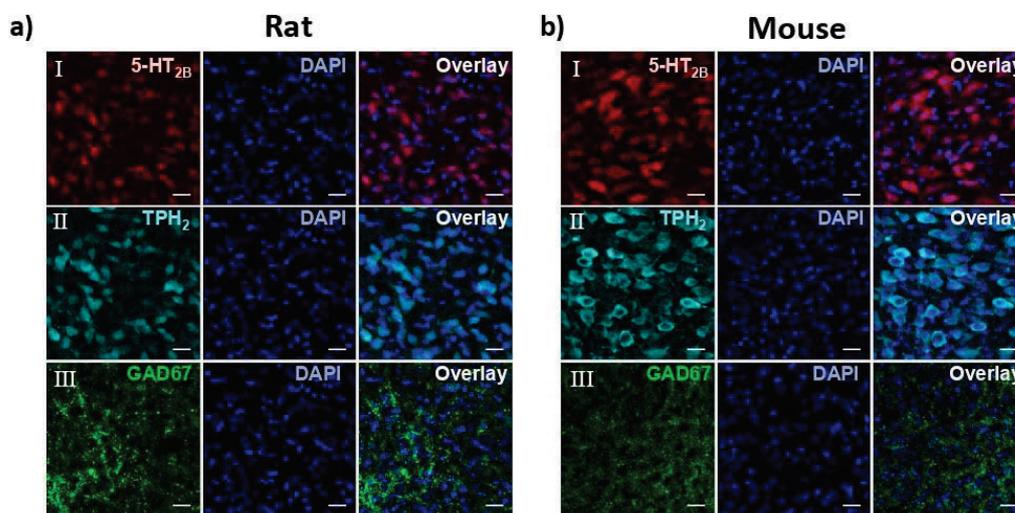
- Akyuz, E., Doganyigit, Z., Paudel, Y.N., Koklu, B., Kaymak, E., Villa, C., Arulsamy, A., Shaikh, Mohd.F., Devinsky, O., 2021. Immunoreactivity of muscarinic acetylcholine M2 and serotonin 5-HT2B receptors, norepinephrine transporter and Kir channels in a model of epilepsy. *Life* 11, 276. <https://doi.org/10.3390/life11040276>.
- Auclair, A.L., Cathala, A., Sarrazin, F., Depoortère, R., Piazza, P.V., Newman-Tancredi, A., Spampinato, U., 2010. The central serotonin2B receptor: a new pharmacological target to modulate the mesoaccumbens dopaminergic pathway activity: 5-HT2B receptors and dopamine release. *J. Neurochem.* <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06848.x> no-no.
- Bang, S.J., Commons, K.G., 2012. Forebrain GABAergic projections from the dorsal raphe nucleus identified by using GAD67-GFP knock-in mice. *J. Comp. Neurol.* 520, 4157–4167. <https://doi.org/10.1002/cne.23146>.
- Belmer, A., Quentin, E., Diaz, S.L., Guiard, B.P., Fernandez, S.P., Doly, S., Banas, S.M., Pitychoutis, P.M., Moutkine, I., Muzerelle, A., Tchenio, A., Roumier, A., Mameli, M., Maroteaux, L., 2018. Positive regulation of raphe serotonin neurons by serotonin 2B receptors. *Neuropsychopharmacology* 43, 1623–1632. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0013-0>.
- Bonaventure, P., Guo, H., Tian, B., Liu, X., Bittner, A., Roland, B., Salunga, R., Ma, X.-J., Kamme, F., Meurers, B., Bakker, M., Jurzak, M., Leysen, J.E., Erlander, M.G., 2002. Nuclei and subnuclei gene expression profiling in mammalian brain. *Brain Res.* 943, 38–47. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)02504-0](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)02504-0).
- Bonhaus, D.W., Flippin, L.A., Greenhouse, R.J., Jaime, S., Rocha, C., Dawson, M., Van Natta, K., Chang, L.K., Pulido-Rios, T., Webber, A., Leung, E., Eglen, R.M., Martin, G.R., 1999. RS-127445: a selective, high affinity, orally bioavailable 5-HT 2B receptor antagonist. *RS-127445: a selective 5-HT 2B receptor antagonist*. *Br. J. Pharmacol.* 127, 1075–1082. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702632>.
- Cathala, A., Devroye, C., Drutel, G., Revest, J.-M., Artigas, F., Spampinato, U., 2019. Serotonin2B receptors in the rat dorsal raphe nucleus exert a GABA-mediated tonic inhibitory control on serotonin neurons. *Exp. Neurol.* 311, 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.09.015>.
- Cathala, A., Devroye, C., Robert, É., Vallée, M., Revest, J.-M., Artigas, F., Spampinato, U., 2020. Serotonin2B receptor blockade in the rat dorsal raphe nucleus suppresses cocaine-induced hyperlocomotion through an opposite control of mesocortical and mesoaccumbens dopamine pathways. *Neuropharmacology* 180, 108309. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108309>.
- Celada, P., Puig, M.V., Casanovas, J.M., Guillazo, G., Artigas, F., 2001. Control of dorsal raphe serotonergic neurons by the medial prefrontal cortex: involvement of serotonin-1A, GABA a, and glutamate receptors. *J. Neurosci.* 21, 9917–9929. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-24-09917.2001>.
- Chang, W., Kanda, H., Ikeda, R., Ling, J., DeBerry, J.J., Gu, J.G., 2016. Merkel disc is a serotonergic synapse in the epidermis for transmitting tactile signals in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113 <https://doi.org/10.1073/pnas.1610176113>.
- Cussac, D., Newman-Tancredi, A., Quentric, Y., Carpentier, N., Poissonnet, G., Parmentier, J.-G., Goldstein, S., Millan, M., 2002. Characterization of phospholipase C activity at h5-HT 2C compared with h5-HT 2B receptors: influence of novel ligands upon membrane-bound levels of [3 H]phosphatidylinositols. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 365, 242–252. <https://doi.org/10.1007/s00210-001-0505-y>.
- Devroye, C., Cathala, A., Di Marco, B., Caraci, F., Drago, F., Piazza, P.V., Spampinato, U., 2015. Central serotonin2B receptor blockade inhibits cocaine-induced hyperlocomotion independently of changes of subcortical dopamine outflow. *Neuropharmacology* 97, 329–337. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.06.012>.
- Devroye, C., Cathala, A., Haddjeri, N., Rovera, R., Vallée, M., Drago, F., Piazza, P.V., Spampinato, U., 2016. Differential control of dopamine ascending pathways by serotonin2B receptor antagonists: new opportunities for the treatment of schizophrenia. *Neuropharmacology* 109, 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.05.024>.
- Devroye, C., Cathala, A., Piazza, P.V., Spampinato, U., 2018. The central serotonin2B receptor as a new pharmacological target for the treatment of dopamine-related neuropsychiatric disorders: rationale and current status of research. *Pharmacol. Ther.* 181, 143–155. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.07.014>.
- Devroye, C., Haddjeri, N., Cathala, A., Rovera, R., Drago, F., Piazza, P.V., Artigas, F., Spampinato, U., 2017. Opposite control of mesocortical and mesoaccumbal dopamine pathways by serotonin 2B receptor blockade: involvement of medial prefrontal cortex serotonin 1A receptors. *Neuropharmacology* 119, 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.04.001>.
- Diaz, S.L., Doly, S., Narboux-Nême, N., Fernández, S., Mazot, P., Banas, S.M., Boutourlinsky, K., Moutkine, I., Belmer, A., Roumier, A., Maroteaux, L., 2012. 5-HT2B receptors are required for serotonin-selective antidepressant actions. *Mol. Psychiatry* 17, 154–163. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.159>.
- Doly, S., Bertran-Gonzalez, J., Callebert, J., Bruneau, A., Banas, S.M., Belmer, A., Boutourlinsky, K., Hervé, D., Launay, J.-M., Maroteaux, L., 2009. Role of serotonin via 5-HT2B receptors in the reinforcing effects of MDMA in mice. *PLoS ONE* 4, e7952. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007952>.
- Doly, S., Quentin, E., Eddine, R., Tolu, S., Fernandez, S.P., Bertran-Gonzalez, J., Valjent, E., Belmer, A., Vinals, X., Callebert, J., Faure, P., Meye, F.J., Hervé, D., Robledo, P., Mameli, M., Launay, J.-M., Maldonado, R., Maroteaux, L., 2017. Serotonin 2B receptors in mesoaccumbens dopamine pathway regulate cocaine responses. *J. Neurosci.* 37, 10372–10388. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1354-17.2017>.
- Doly, S., Valjent, E., Setola, V., Callebert, J., Hervé, D., Launay, J.-M., Maroteaux, L., 2008. Serotonin 5-HT2B receptors are required for 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced hyperlocomotion and 5-HT release in vivo and in vitro. *J. Neurosci.* 28, 2933–2940. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5723-07.2008>.
- Duxon, M.S., Flanigan, T.P., Reavley, A.C., Baxter, G.S., Blackburn, T.P., Fone, K.C.F., 1997. Evidence for expression of the 5-hydroxytryptamine-2B receptor protein in the rat central nervous system. *Neuroscience* 76, 323–329. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(96\)00480-0](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(96)00480-0).
- Hajós, M., Richards, C.D., Székely, A.D., Sharp, T., 1998. An electrophysiological and neuroanatomical study of the medial prefrontal projection to the midbrain raphe nuclei in the rat. *Neuroscience* 87, 95–108. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(98\)00157-2](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00157-2).
- Hamati, R., El Mansari, M., Blier, P., 2020. Serotonin-2B receptor antagonism increases the activity of dopamine and glutamate neurons in the presence of selective serotonin reuptake inhibition. *Neuropsychopharmacology* 45, 2098–2105. <https://doi.org/10.1038/s41386-020-0723-y>.
- Ju, A., Fernandez-Arroyo, B., Wu, Y., Jacky, D., Beyeler, A., 2020. Expression of serotonin 1A and 2A receptors in molecular- and projection-defined neurons of the mouse insular cortex. *Mol. Brain* 13, 99. <https://doi.org/10.1186/s13041-020-00605-5>.
- Kuhn, D.M., Sykes, C.E., Geddes, T.J., Jaunarajs, K.L.E., Bishop, C., 2011. Tryptophan hydroxylase 2 aggregates through disulfide cross-linking upon oxidation: possible link to serotonin deficits and non-motor symptoms in Parkinson's disease: TPH2 misfolding and 5HT deficits in PD. *J. Neurochem.* 116, 426–437. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07123.x>.
- Launay, J.M., Schneider, B., Loric, S., Prada, M.D., Kellermann, O., 2006. Serotonin transport and serotonin transporter-mediated antidepressant recognition cells are controlled by 5-HT 2B receptor signaling in serotonergic neuronal cells. *FASEB J.* 20, 1843–1854. <https://doi.org/10.1096/fj.06-5724com>.
- Ling, L.L., Hughes, L.F., Caspary, D.M., 2005. Age-related loss of the GABA synthetic enzyme glutamic acid decarboxylase in rat primary auditory cortex. *Neuroscience* 132, 1103–1113. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.12.043>.
- López-Terrones, E., Celada, P., Riga, M.S., Artigas, F., 2022. Preferential in vivo inhibitory action of serotonin in rat infralimbic vs. prelimbic cortex: relevance for antidepressant treatments. *Cereb. Cortex* 2021 (00), 1–14. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhab396>.
- Marinelli, S., Schnell, S.A., Hack, S.P., Christie, M.J., Wessendorf, M.W., Vaughan, C.W., 2004. Serotonergic and nonserotonergic dorsal raphe neurons are pharmacologically and electrophysiologically heterogeneous. *J. Neurophysiol.* 92, 3532–3537. <https://doi.org/10.1152/jn.00437.2004>.
- Maroteaux, L., Ayme-Dietrich, E., Aubertin-Kirch, G., Banas, S., Quentin, E., Lawson, R., Monassier, L., 2017. New therapeutic opportunities for 5-HT2B receptor ligands. *Pharmacol. Ther.* 170, 14–36. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.10.008>.
- Monti, J.M., 2010. The structure of the dorsal raphe nucleus and its relevance to the regulation of sleep and wakefulness. *Sleep Med. Rev.* 14, 307–317. <https://doi.org/10.1016/j.smrv.2009.11.004>.
- Murphy, K.L., Zhang, X., Gainetdinov, R.R., Beaulieu, J.-M., Caron, M.G., 2008. A regulatory domain in the N terminus of tryptophan hydroxylase 2 controls enzyme expression. *J. Biol. Chem.* 283, 13216–13224. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706749200>.

- Muzerelle, A., Scotto-Lomassese, S., Bernard, J.F., Soiza-Reilly, M., Gaspar, P., 2016. Conditional anterograde tracing reveals distinct targeting of individual serotonin cell groups (B5–B9) to the forebrain and brainstem. *Brain Struct. Funct.* 221, 535–561. <https://doi.org/10.1007/s00429-014-0924-4>.
- Nebigil, C.G., Choi, D.S., Dierich, A., Hickel, P., Le Meur, M., Messaddeq, N., Launay, J.M., Maroteaux, L., 2000. Serotonin 2B receptor is required for heart development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 9508–9513. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.17.9508>.
- Okaty, B.W., Commons, K.G., Dymecki, S.M., 2019. Embracing diversity in the 5-HT neuronal system. *Nat. Rev. Neurosci.* 20, 397–424. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0151-3>.
- Paxinos, G., Franklin, K.B.J., 2001. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, second ed. Academic Press.
- Paxinos, G., Watson, C., 2005. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6th ed. Academic Press.
- Pitychoutis, P.M., Belmer, A., Moutkine, I., Adrien, J., Maroteaux, L., 2015. Mice lacking the serotonin Htr2B receptor gene present an antipsychotic-sensitive schizophrenic-like phenotype. *Neuropsychopharmacology* 40, 2764–2773. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.126>.
- Pollak Dorocic, I., Fürth, D., Xuan, Y., Johansson, Y., Pozzi, L., Silberberg, G., Carlén, M., Meletis, K., 2014. A whole-brain atlas of inputs to serotonergic neurons of the dorsal and median raphe nuclei. *Neuron* 83, 663–678. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.07.002>.
- Puig, M.V., Artigas, F., Celada, P., 2004. Modulation of the activity of pyramidal neurons in rat prefrontal cortex by raphe stimulation in vivo: involvement of serotonin and GABA. *Cereb. Cortex* 15, 1–14. <https://doi.org/10.1093/cercor/bbh104>.
- Ren, J., Friedmann, D., Xiong, J., Liu, C.D., Ferguson, B.R., Weerakkody, T., DeLoach, K.E., Ran, C., Pun, A., Sun, Y., Weissbourd, B., Neve, R.L., Huguenard, J., Horowitz, M.A., Luo, L., 2018. Anatomically defined and functionally distinct dorsal raphe serotonin sub-systems. *Cell* 175, 472–487. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.043> e20.
- Ren, J., Isakova, A., Friedmann, D., Zeng, J., Grutzner, S.M., Pun, A., Zhao, G.Q., Kolluru, S.S., Wang, R., Lin, R., Li, P., Li, A., Raymond, J.L., Luo, Q., Luo, M., Quake, S.R., Luo, L., 2019. Single-cell transcriptomes and whole-brain projections of serotonin neurons in the mouse dorsal and median raphe nuclei. *elife* 8, e49424. <https://doi.org/10.7554/eLife.49424>.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
- Shikanai, H., Yoshida, T., Konno, K., Yamasaki, M., Izumi, T., Ohmura, Y., Watanabe, M., Yoshioka, M., 2012. Distinct neurochemical and functional properties of GAD67-containing 5-HT neurons in the rat dorsal raphe nucleus. *J. Neurosci.* 32, 14415–14426. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5929-11.2012>.
- Varea, E., Nacher, J., Blasco-Ibáñez, J.M., Gómez-Climent, M.Á., Castillo-Gómez, E., Crespo, C., Martínez-Guijarro, F.J., 2005. PSA-NCAM expression in the rat medial prefrontal cortex. *Neuroscience* 136, 435–443. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.08.009>.
- Varga, V., Székely, A.D., Csillag, A., Sharp, T., Hajós, M., 2001. Evidence for a role of GABA interneurons in the cortical modulation of midbrain 5-hydroxytryptamine neurons. *Neuroscience* 106, 783–792. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00294-9](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00294-9).
- Weissbourd, B., Ren, J., DeLoach, K.E., Guenther, C.J., Miyamichi, K., Luo, L., 2014. Presynaptic Partners of Dorsal Raphe Serotonergic and GABAergic neurons. *Neuron* 83, 645–662. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.06.024>.
- Yamashiro, K., Liu, J., Matsumoto, N., Ikegaya, Y., 2021. Deep learning-based classification of GAD67-positive neurons without the immunosignal. *Front. Neuroanat.* 15, 643067. <https://doi.org/10.3389/fnana.2021.643067>.

## Supplemental material

### Differential expression of serotonin<sub>2B</sub> receptors in GABAergic and serotonergic neurons of the rat and mouse dorsal raphe nucleus.

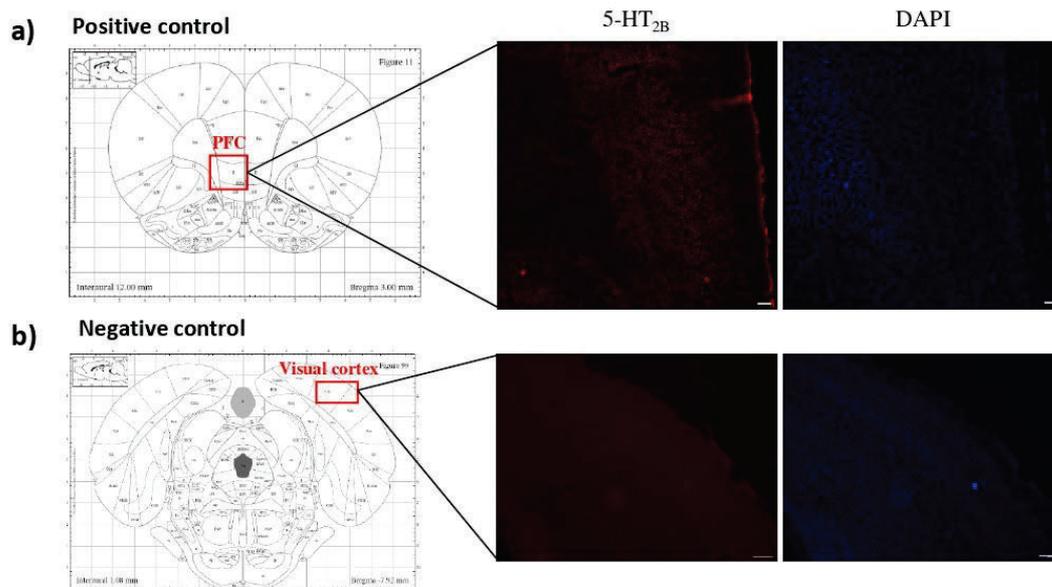
Cathala *et al.*



**Fig. S1:** Representative examples of the labelling of serotonin<sub>2B</sub> (5-HT<sub>2B</sub>) receptors, tryptophan hydroxylase 2 (TPH<sub>2</sub>) and glutamic acid decarboxylase 67 (GAD67) in the dorsal raphe nucleus (DRN) of rats (a) and mice (b). Confocal microscopy images illustrating 5-HT<sub>2B</sub> receptor (I, red), TPH<sub>2</sub> (II, cyan) and GAD67 (III, green) labeling, together with cell nuclei staining with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and their overlay. Note the clear association of DAPI-labelled cell nuclei with cellular profiles labelled with 5-HT<sub>2B</sub> and TPH<sub>2</sub> antibodies. In contrast, the GAD67 labelling was patchy, as previously reported in the literature (Shikanai et al., 2012; Yamashiro et al., 2021, Ju et al., 2020). Scale bars: 20µm.

## Differential expression of serotonin<sub>2B</sub> receptors in GABAergic and serotonergic neurons of the rat and mouse dorsal raphe nucleus.

Cathala *et al.*



**Fig. S2:** Positive and negative controls of serotonin<sub>2B</sub> (5-HT<sub>2B</sub>) receptors immunostaining in the prefrontal cortex (PFC, **a**) and the visual cortex (**b**). *Left panels:* schematic diagrams, taken from the Paxinos and Watson atlas of rat brain (2005), showing the anatomical localization of the PFC and the visual cortex. *Right panels:* Microscopy images illustrating coronal sections at the level of the PFC and the visual cortex showing the 5-HT<sub>2B</sub> receptor labelling (in red) and the counterstaining with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Note the absence of 5-HT<sub>2B</sub> receptor labelling in layer I of the PFC, mainly composed by thalamo-cortical fibers and subtypes of GABA interneurons (e.g., 5-HT<sub>3</sub> receptor-expressing) controlling excitatory inputs onto the tufts of apical dendrites of pyramidal neurons. Scale bars: 100  $\mu$ m.



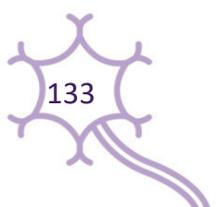
# Informe del director (Tesis por artículos)

FRANCESC ARTIGAS PÉREZ, Professor d' Investigació "Ad honorem" de l' Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, (CSIC-IDIBAPS) i Director de la Tesi doctoral "Papel de la corteza infralímbica en el trastorno depresivo mayor: relevancia para nuevas estrategias antidepresivas", presentada per la Sra. Elena López Terrones, INFORMA que els treballs de recerca que formen part de l' esmentada Tesi s'han publicat fins ara en 2 articles en revistes científiques:

1. **López Terrones E**, Celada P, Riga MS, Artigas F (2022). Preferential in vivo inhibitory action of serotonin in rat infralimbic vs. prelimbic cortex: Relevance for antidepressant treatments. *Cerebral Cortex* 32(14):3000-3013. **IF 2021: 4.51** <https://www.resurchify.com/find/?query=cerebral+cortex>. La revista pertany al **1er quartil** dels camps de la Neurociència cel·lular i molecular i de la Neurociència cognitiva.
2. Cathala A, Lucas G, **López Terrones E**, Revest JM, Artigas F, Spampinato U (2022). Differential expression of serotonin2B receptors in GABAergic and serotonergic neurons of the rat and mouse dorsal raphe nucleus. *Molecular and Cellular Neuroscience* Jul;121:103750. **IF 2021: 4.53**. <https://www.resurchify.com/impact/details/17379>. La revista pertany el **1er tercil** del camp d'ela Biologia Molecular.

Un 3er article, en el qual la Sra. López Terrones es la única 1<sup>a</sup> autora, està en fase molt avançada de redacció i es preveu el seu enviament immediat a publicació:

3. **López Terrones E**, Paz V, Campa L, Conde-Berriozabal, Masana M, Artigas F, Riga MS (2022). Differential modulation of dorsal raphe serotonergic activity in rat brain by the infralimbic and prelimbic cortices. *International Journal of Molecular Sciences*. (en preparació). **IF: 6.208**. La revista pertany a **1er quartil** de diversos camps, entre ells el de la Medicina (miscel·lània). <https://www.resurchify.com/impact/details/25879>



Així mateix, faig constar que cap dels treballs s'ha utilitzat en cap altra Tesi doctoral que la de la Sra. López Terrones. En els treballs 1 i 3 ella ha estat la única 1ª autora, mentre que el treball nº 2 es un article col·laboració amb el grup del Dr. Spampinato, de la Univ. de Bordeaux, en el que la Dra. Adéline Cathala es la responsable de la major part del treball experimental.

Firmado por ARTIGAS  
PEREZ, FRANCESC (FIRMA)  
el día 16/01/2023 con  
un certificado emitido  
por AC DNIE 006

Barcelona, 13 de Gener 2023

Francesc Artigas Pérez

# Resumen de resultados

## Trabajo 1. Acción preferentemente inhibitoria de la 5-HT *in vivo* en la corteza IL de rata versus la PrL: relevancia para tratamientos antidepresivos

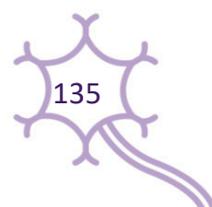
---

La corteza IL en roedores es equivalente a la CCAv en humanos, la cual juega un papel clave en la fisiopatología y tratamiento del TDM. Asimismo, la modulación de la neurotransmisión glutamatérgica en IL (pero no en la corteza PrL, adyacente a IL) provoca efectos antidepresivos (Gasull-Camós et al., 2017, 2018) o comportamientos depresivos (Fullana et al., 2019b; Fullana, Gasull-Camós et al., 2020), asociados a cambios en la función 5-HT, destacando la relevancia de las interacciones glutamato/5-HT en la corteza IL para el control emocional.

Estudios previos muestran como la 5-HT modula la actividad neuronal en las cortezas PrL y AC (Puig et al., 2005), sin embargo, se desconocen sus efectos sobre la corteza IL. Por ello en este estudio se ha comparado los efectos de la 5-HT *in vivo* sobre la actividad de las neuronas piramidales de IL (n= 61) y PrL (n=50) en ratas anestesiadas. El estudio muestra que las **neuronas piramidales de IL son más sensibles a la estimulación del NRD** (0.9 Hz) que las neuronas de PrL (84% vs. 64%, respectivamente) **y se inhiben en mayor proporción** (64% vs. 36%, respectivamente). Por otro lado, las activaciones ortodrómicas solo se observan en PrL (8%), estando ausentes en IL, mientras que las respuestas bifásicas ocurren en la misma proporción en ambas áreas (20%).

Con respecto a los mecanismos involucrados en las respuestas observadas, mostramos que **los 5-HT<sub>2A</sub>-R son responsables de las excitaciones**, mientras que **las inhibiciones** están mediadas al menos por tres componentes diferentes, incluyendo **los 5-HT<sub>1A</sub>-R y los GABA<sub>A</sub>-R en las propias neuronas piramidales, así como por los 5-HT<sub>3</sub>-R localizados en interneuronas GABAérgicas**.

Así pues, la marcada acción inhibitoria de la 5-HT en IL sugiere que los **fármacos antidepresivos basados en el aumento de la concentración extracelular o sináptica de 5-HT pueden estar ejerciendo su acción terapéutica a través de la normalización de la hiperactividad glutamatérgica en la CCAv de pacientes con TDM**.



## Trabajo 2. Distinto control de la actividad 5-HT del NRD por las cortezas IL y PrL en el cerebro de rata

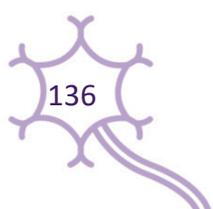
---

Dados los antecedentes que indican que el aumento de la actividad glutamatérgica en IL (pero no en PrL) induce comportamientos de tipo depresivo o antidepresivo en roedores, asociados a cambios de neurotransmisión 5-HT, llevamos a cabo un estudio sobre el posible control diferencial de la actividad 5-HT en el NRD por parte de IL y PrL. Para ello, se compararon los efectos *in vivo* de las estimulaciones de IL y PrL sobre la actividad de las neuronas 5-HT del NRD y la liberación de 5-HT en el NRD de ratas anestesiadas. Los resultados de ambos trabajos (1 y 2) son complementarios y mejoran la comprensión de los circuitos existentes entre la CPFm y el NRD, de vial importancia en el control de los estados de ánimo.

Así, la **estimulación eléctrica de IL y PrL a 0,9 Hz induce un efecto preferentemente inhibitorio sobre la actividad de las neuronas 5-HT** similar en ambas áreas (53 % y 48 %, respectivamente). Sin embargo, la estimulación a **frecuencias más altas** (10 Hz y 20 Hz) representativas de la actividad fásica de la CPFm, mostró que **IL aumenta la frecuencia de descarga de una mayor proporción de neuronas 5-HT que PrL** (80% vs. 64%, respectivamente a 10 Hz; 86% vs. 59%, respectivamente a 20Hz). Por otro lado, las **respuestas de las neuronas 5-HT a la estimulación de IL (pero no de PrL) a 20 Hz se potenciaron con PIC**, lo que sugiere la participación de los **GABA<sub>A</sub>-R en el NRD**.

Con respecto a la liberación de 5-HT en el NRD, tanto las **estimulaciones eléctricas como las optogénicas de IL y PrL aumentan la concentración extracelular de 5-HT en NRD** de manera dependiente de la frecuencia, observándose los **aumentos más importantes tras la estimulación de IL a 20 Hz**.

En conjunto, estos datos respaldan un **control diferencial de la actividad 5-HT por IL y PrL, con un papel aparentemente superior de IL, lo que puede ayudar a aclarar los circuitos cerebrales involucrados en la fisiopatología y el tratamiento de MDD**.



### Trabajo 3. Diferente expresión de 5-HT<sub>2B</sub>-R en neuronas 5-HT y GABAérgicas en el NRD de rata y de ratón

---

El 5-HT<sub>2B</sub>-R modula tanto la función 5-HT como dopaminérgica en el cerebro y ha sido sugerido como una potencial diana para el tratamiento de trastornos neuropsiquiátricos relacionados con desajustes en los sistemas monoaminérgicos, como la esquizofrenia y el TDM, entre otros. Diversos estudios realizados en rata y ratón muestran resultados contradictorios en el control de los sistemas 5-HT y dopaminérgicos. Estas discrepancias pueden ser el reflejo de diferencias anatomo-funcionales relacionadas con una distinta localización de 5-HT<sub>2B</sub>-R en el cerebro de rata y ratón.

Así, mediante inmunohistoquímica, se ha examinado la expresión del 5-HT<sub>2B</sub>-R en las neuronas 5-HT y GABAérgicas de ratas y ratones dentro de las distintas subregiones del NRD, lugar de acción de los fármacos 5-HT<sub>2B</sub> que modulan la actividad de los sistemas 5-HT y dopaminérgico. Del mismo modo, utilizando microdiálisis *in vivo*, se examinó su relevancia funcional en el control de la liberación de 5-HT en el NRD.

Los datos mostraron que, en ambas especies, los 5-HT<sub>2B</sub>-R se expresan en células 5-HT que expresan *triptófano hidroxilasa 2* (TPH<sub>2</sub>), en células GABAérgicas que expresan *descarboxilasa del ácido glutámico 67* (GAD67), y en células que expresan ambos marcadores (neuronas 5-HT que expresan GABA). Sin embargo, el **porcentaje de células solo TPH<sub>2</sub> que expresaban 5-HT<sub>2B</sub>-R es significativamente mayor en el NRD de ratón que en el de rata, mientras que se observa lo contrario con respecto a las células que expresan GAD67 y TPH<sub>2</sub>**. No se observaron grandes diferencias en las subdivisiones dorsal y ventral del NRD; sin embargo, en la **subdivisión NRDI se observaron grandes diferencias, con una expresión de 5-HT<sub>2B</sub>-R predominante en células TPH<sub>2</sub> en ratones (67.2% vs. 19.9% en ratas), junto con una menor expresión del receptor en células GAD67 y TPH<sub>2</sub> (7.9% en ratones vs. 41.5% en ratas)**. Por otra parte, la administración intra-NRD del agonista 5-HT<sub>2B</sub>-R (BW 723C86) disminuyó y aumentó la liberación de 5-HT en el NRD de ratas y ratones, respectivamente, siendo revertidos ambos efectos por la perfusión intra-NRD del antagonista 5-HT<sub>2B</sub>-R (RS 127445).

En conjunto, estos datos indican la **existencia de diferencias anatómicas en la expresión celular del 5-HT<sub>2B</sub>-R in el NRD de rata y ratón, lo que se traduce en un control opuesto de la activación de tal receptor sobre la liberación de 5-HT**. Estos resultados también destacan la relevancia del subgrupo de neuronas 5-HT que expresan GABA como un factor clave responsable de las diferencias funcionales entre ratas y ratones con respecto a la modulación de la actividad 5-HT.

A su vez, estos resultados pueden contribuir, ni que sea parcialmente, a **esclarecer las diferencias rata-ratón en cuanto a los efectos de tipo depresivo/antidepresivo y cambios asociados en neurotransmisión 5-HT tras la estimulación glutamatérgica de la CPFm.**

# Discusión

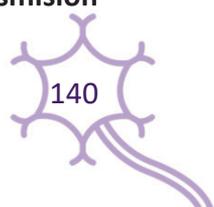
Los resultados de la presente tesis se enmarcan en el estudio de los **circuitos cerebrales implicados en la fisiopatología y tratamiento de los trastornos depresivos**. Al igual que en otras enfermedades del SNC, los trastornos psiquiátricos (entre ellos, los trastornos depresivos) son el resultado de la **disfunción de complejos circuitos cerebrales** implicados en el control del estado de ánimo, el comportamiento, la memoria, el apetito, los ciclos sueño-vigilia, etc., cuyas alteraciones conforman la compleja sintomatología de los trastornos depresivos. En concreto, en la presente tesis se han estudiado los **circuitos existentes entre el NRD y las cortezas PrL e IL**, subdivisiones de la CPF, bajo la hipótesis de trabajo de que las relaciones funcionales entre NRD y PrL son distintas de las existentes entre NRD e IL. En concreto, que la estimulación del NRD puede modular de manera diferente la actividad neuronal del área PrL e IL, así como que PrL e IL podrían ejercer un control diferencial en la actividad de neuronas 5-HT (Ver sección de Hipótesis y Objetivos)

Tal como se menciona en la Introducción, diversas zonas de la **CPF** juegan un papel clave en el control de las **funciones cognitivas y ejecutivas**, así como en el **control de los estados emocionales**. Por otra parte, el **sistema 5-HT** es esencial para el mantenimiento de la **resiliencia frente a situaciones adversas**, siendo además **la diana de la mayor parte de los fármacos antidepresivos**. Por ello, un mejor conocimiento de los circuitos NRD-PrL y NRD-IL puede aportar nuevas claves para la comprensión de la sintomatología depresiva y la aparición de nuevos episodios depresivos, así como para el diseño de nuevas dianas terapéuticas en el tratamiento del TDM.

En este sentido, los trabajos 1 y 2 de la tesis muestran como la **relación funcional entre la IL y el NRD es claramente distinta de la existente entre PrL y el NRD**, en ambos sentidos (neurotransmisión 5-HT ascendente y glutamatérgica descendente). Así, los resultados del trabajo 1 muestran como la **estimulación fisiológica de las vías 5-HT ascendentes originadas en el NRD afecta a un mayor porcentaje de neuronas piramidales de IL que de PrL (84% vs. 64%)**, induciendo además una **mayor respuesta inhibitoria en las neuronas piramidales de IL que en las de PrL**.

Por otra parte, la **estimulación de IL a 10-20 Hz** (características del comportamiento fásico de la actividad cortical) así como la acción de fármacos glutamatérgicos en IL o PrL, **afecta una mayor proporción de neuronas 5-HT del NRD y aumentan más la liberación de 5-HT que las mismas estimulaciones realizadas en PrL**. Asimismo, los mecanismos implicados en las vías IL-NRD y PrL-NRD difieren en cuanto a una **mayor participación de interneuronas GABA en el NRD en la vía IL-NRD**.

Estas diferencias entre las vías IL-NRD y PrL-NRD permiten aportar nueva luz a observaciones previas de nuestro laboratorio en las que se observa que un **aumento de la neurotransmisión**

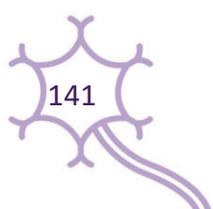


**glutamatérgica en IL induce cambios comportamentales y neuroquímicos que no se observan cuando dicha estimulación se realiza en PrL.** Así, en experimentos llevados a cabo en ratas, el bloqueo agudo del transportador glial de glutamato GLT-1 (que induce una activación de receptores AMPA-R) en IL se traduce en un efecto antidepressivo, asociado a un aumento de la liberación local de 5-HT, efectos que no se observan cuando GLT-1 se administra en PrL (Gasull-Camós et al., 2017). En cambio, experimentos realizados en ratón muestran como una hiperactividad glutamatérgica persistente, inducida por la administración local de siRNA dirigidos contra GLT-1 y GLAST, -este último, también transportador glial de glutamato- en IL induce un fenotipo depresivo, asociado a una reducción de la liberación de 5-HT (Fullana et al., 2019b). Igual que en el estudio de Gasull-Camós et al (2017), la inducción de la hiperactividad glutamatérgica en PrL de ratón no induce el fenotipo depresivo ni reduce la liberación de 5-HT (Fullana et al., 2019b).

Aunque la diferencia entre ambos estudios puede ser debida a múltiples razones, los resultados del trabajo 3 aportan un nuevo elemento en la compleja regulación de la actividad serotoninérgica, mostrando una **distinta implicación de fenómenos autoinhibitorios en neuronas 5-HT en rata y ratón**, a través de **5-HT<sub>2B</sub>-R excitatorios expresados en interneuronas GABA del NRD**. Así, un aumento de las aferencias excitatorias procedentes de la CPF podría estar regulando de forma diferencial la actividad de las neuronas 5-HT a través de un **distinto balance excitación/inhibición en rata y ratón en el NRD**.

## Control de la actividad de la CPFm (subdivisiones PrL e IL) por la serotonina endógena (Trabajo 1)

A través de los resultados obtenidos en el trabajo 1 de la presente tesis, se demuestran marcadas diferencias regionales en la modulación *in vivo* de la actividad de neuronas piramidales de la CPFm de rata por la 5-HT, con una **notable acción inhibitoria en IL**, donde una gran proporción de neuronas piramidales fueron sensibles a la estimulación del NRD. Las **respuestas de inhibición** fueron mediadas por al menos 3 mecanismos distintos, que implican los **5-HT<sub>1A</sub>-R de neuronas piramidales y los 5-HT<sub>3</sub>-R presentes en neuronas GABAérgicas**, así como la activación de los **GABA<sub>A</sub>-R localizados en neuronas piramidales**.



Estos resultados son totalmente novedosos, ya que hasta la fecha no existían estudios que muestren un control diferencial de la actividad de las neuronas piramidales de IL y PrL por parte de la 5-HT. Dado el papel clave de la CCAv (y de IL en modelos animales) en el control emocional y en la fisiopatología y tratamiento del TDM, los datos obtenidos representan una información relevante para conseguir un mejor entendimiento del papel del sistema 5-HT en la regulación emocional por parte de la CPFm y su potencial relevancia para el tratamiento antidepresivo.

## Diferente sensibilidad de IL y PrL a la estimulación del núcleo del rafe dorsal

---

La **mayor proporción de neuronas de IL sensibles a la acción del NRD** (84%) frente a aquellas de PrL (64%), junto con el mayor porcentaje de respuestas de inhibición pura en IL (64%) que en PrL (36%) indica una **acción inhibitoria de la 5-HT mucho mayor en IL que en PrL**.

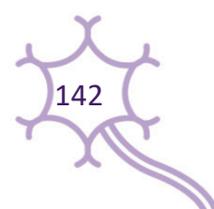
Por otra parte, las respuestas de **activación ortodrómica pura** solo fueron encontradas en un pequeño porcentaje de las neuronas piramidales de **PrL** (8%), siendo **ausentes en IL**, mientras que las **respuestas bifásicas** fueron observadas de manera similar en ambas subdivisiones de la CPFm. Hay que mencionar que la alta coexpresión de 5-HT<sub>1A</sub>-R y 5-HT<sub>2A</sub>-R en la CPFm (Amargós-Bosch et al., 2004) podría explicar la presencia de respuestas bifásicas. A su vez, las neuronas piramidales de IL ejercen una influencia inhibitoria fásica sobre las neuronas piramidales de PrL (Ji & Neugebauer, 2012). Dado el notable efecto inhibitorio que presenta la estimulación del NRD sobre las neuronas de IL, este mecanismo podría contribuir a la desinhibición de las neuronas piramidales de PrL y facilitar respuestas excitatorias en esta área.

De este modo, los datos del trabajo 1 apoyan la idea del **papel principal que ejerce la 5-HT en las funciones que dependen de la CPF** (Robbins & Arnsten, 2009) a través de la modulación de una gran proporción de neuronas piramidales de proyección, con una **acción inhibitoria mayor en IL que en PrL o en AC** (López-Terrones et al., 2022; Puig et al., 2005).

## Mecanismos implicados

---

Por un lado, la acción inhibitoria de la estimulación del NRD sobre las neuronas de IL y PrL parece estar relacionada con, al menos, 3 mecanismos distintos (**Figura 20**):



- La activación directa del **5-HT<sub>1A</sub>-R inhibitorios presentes en las neuronas piramidales registradas**
- La activación del receptor ionotrópico excitatorio **5-HT<sub>3</sub> de interneuronas GABAérgicas** que controlan la actividad de neuronas piramidales
- La activación del **GABA<sub>A</sub>-R en neuronas piramidales registradas** a través de las proyecciones GABAérgicas directas desde el NRD hasta la CPFm.

Podría incluirse un cuarto mecanismo relacionado con la **activación del 5-HT<sub>2A</sub>-R en interneuronas GABAérgicas** locales debido al incremento paradójico de respuestas excitatorias tras el bloqueo del 5-HT<sub>2A</sub>-R con M100907. Sin embargo, este mecanismo debería confirmarse en estudios posteriores, dado el bajo número de casos observados.

La mayor proporción de **inhibiciones mediadas por 5-HT en IL** es totalmente coherente con la **mayor proporción de expresión neuronal de 5-HT<sub>1A</sub>-R que de 5-HT<sub>2A</sub>-R** en esta área cortical, incluyendo las neuronas piramidales de capa V (55% vs. 22%, respectivamente; Santana & Artigas 2017b). En cambio, **en PrL se encuentra una proporción similar de neuronas piramidales de capa V que expresan 5-HT<sub>1A</sub>-R y 5-HT<sub>2A</sub>-R** (52% y 55%, respectivamente, Santana & Artigas 2017b). Sin embargo, la **estimulación del NRD provoca más respuestas de inhibición** (36%) que activaciones ortodrómicas (8%) o respuestas bifásicas (20%). Esta mayor proporción de respuestas inhibitorias concuerda con estudios previos tanto *in vitro* como *in vivo* (Amargós-Bosch et al., 2004; Araneda & Andrade, 1991; Ashby et al., 1990, 1994; Puig et al., 2005) (ver Celada et al. 2013 para revisión), apoyando la idea de un control 5-HT en la CPF principalmente inhibitorio, a pesar de la expresión de 5-HT-R excitatorios como el 5-HT<sub>2A</sub>-R, 5-HT<sub>2C</sub>-R y 5-HT<sub>4</sub>-R en neuronas piramidales (Lucas et al., 2005; Peñas-Cazorla & Vilaró, 2015; Santana et al., 2004; Santana & Artigas, 2017a).

Esta acción preferentemente inhibitoria puede deberse a varios factores, entre los que se incluyen:

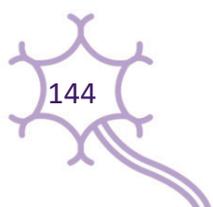
- El **amplio porcentaje de neuronas piramidales que expresan el 5-HT<sub>1A</sub>-R** en todas las subdivisiones de la CPFm, siendo en algunas de ellas, muy superior al de las que expresan el 5-HT<sub>2A</sub>-R (Santana et al., 2004)
- La **mayor afinidad de la 5-HT por los 5-HT<sub>1A</sub>-R en comparación con los 5-HT<sub>2A</sub>-R**

- El hecho de que los **5-HT<sub>1A</sub>-R estén acoplados a canales de K<sup>+</sup> que producen cambios inmediatos** en el potencial de membrana y la descarga neuronal mientras que los **5-HT<sub>2A</sub>-R inducen cambios más lentos y moderados** del potencial de membrana.
- La localización de los **5-HT<sub>1A</sub>-R** en el cono axónico de las neuronas piramidales (DeFelipe et al., 2001), donde la 5-HT puede establecer sinapsis axo-axónicas similares a las sinapsis de GABA (Somogyi et al., 1998), con una influencia directa en la creación de potenciales de acción.

Por otra parte, nuestros resultados muestran por vez primera la implicación del **5-HT<sub>3</sub>-R** en las respuestas de inhibición producidas por la estimulación del NRD. Dicho mecanismo es un nuevo elemento que contribuye a explicar la acción inhibitoria preferente de la 5-HT en CPFm. Este receptor se localiza en **interneuronas GABAérgicas de capas corticales superficiales (I-III)** que contienen calretinina (pero no parvalbumina) (**Figura 7**)(Morales & Bloom, 1997; Puig et al., 2004; Santana & Artigas, 2017b).

Esos resultado *in vivo* coinciden con: 1) estudios previos *in vitro* que muestran que tanto la 5-HT como agonistas del 5-HT<sub>3</sub>-R suprimen la actividad de neuronas piramidales de la CPF de rata a través de la activación de los 5-HT<sub>3</sub>-R (Ashby et al., 1989, 1991, 1992) mediante el incremento de las corrientes inhibitorias postsinápticas que surgen tras la activación de los 5-HT<sub>3</sub>-R de las interneuronas GABAérgicas locales (Férezou et al., 2002; Xiang & Prince, 2003; Zhou & Hablitz, 1999) y 2) estudios previos *in vivo* que muestran que la estimulación del NRD provoca respuestas excitatorias rápidas en interneuronas GABAérgicas superficiales (Puig et al., 2004) y el bloqueo de 5-HT<sub>3</sub>-R aumenta la frecuencia de descarga de una gran parte ( $\approx 70\%$ ) de las neuronas piramidales de capa V de la CPFm (Riga et al., 2016). En conjunto, estos datos muestran que los **5-HT<sub>3</sub>-R son uno de los componentes principales de las respuestas de inhibición de las neuronas piramidales de PrL e IL a la estimulación *in vivo* del NRD**, a pesar de que **están expresados en una pequeña población de interneuronas GABAérgicas de capas I-III de la CPFm** (Puig et al., 2004; Santana & Artigas, 2017b).

Aunque las razones de esta marcada influencia no están del todo claras, se puede destacar el control que ejercen las interneuronas que expresan 5-HT<sub>3</sub>-R en los inputs tálamocorticales de capa I alcanzando los penachos de las dendritas apicales de neuronas piramidales (Jones, 2001; Rubio-Garrido et al., 2009) (**Ver figura 20**). De esta forma, **los 5-HT<sub>3</sub>-R localizados en capas superficiales pueden modular la conectividad entre la matriz talámica, la CPF y estructuras subcorticales**



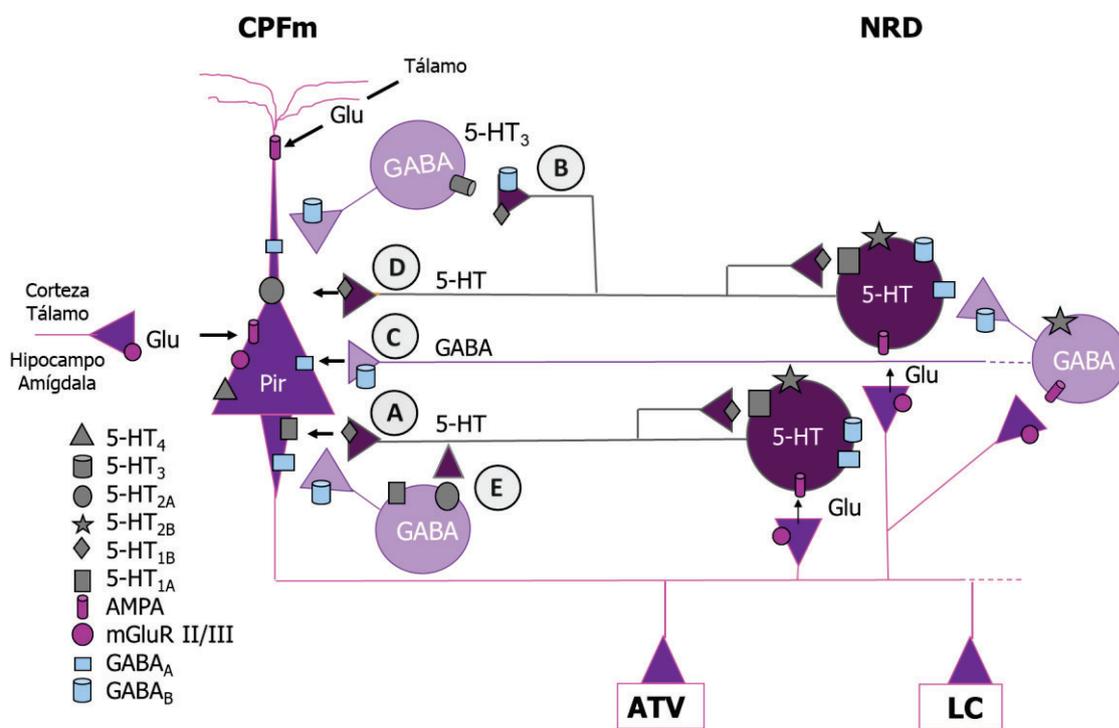
inervadas por las neuronas de capa V, incluyendo los núcleos monoaminérgicos del tronco encefálico, jugando así un papel clave en procesos emocionales y cognitivos regulados por la CPF. En este sentido, el fármaco antidepresivo vortioxetina, que muestra acciones pro-cognitivas, posee una alta afinidad por los 5-HT<sub>3</sub>-R y modula actividad de las neuronas piramidales de CPFm (Riga et al., 2016; Sanchez et al., 2015).

Estudios anatómicos y electrofisiológicos apoyan la existencia de una conectividad recíproca y control mutuo entre la CPFm y el NRD (Celada et al., 2001; Gabbott et al., 2005; Hajós et al., 1998; Puig et al., 2005), un circuito involucrado en el control del ánimo y la resiliencia al estrés (Warden et al., 2012). A la vez que existen las proyecciones 5-HT ascendentes que son bien conocidas, **la vía NRD-CPFm también incluye proyecciones GABAérgicas directas**, tal y como es apoyado por estudios electrofisiológicos (López-Terrones et al., 2022; Puig et al., 2005) y anatómicos (Bang & Commons, 2012b).

Aunque hay una alta proporción de neuronas 5-HT del NRD que co-expresan GAD y probablemente co-liberan GABA (Okaty et al., 2019; Ren et al., 2019), la corta latencia de las respuestas de inhibición provocadas por la estimulación del NRD no puede ser explicada por la coliberación de GABA por los axones 5-HT, ya que la velocidad de conducción de dichos axones es menor que la de los axones glutamatérgicos y GABAérgicos. Así, el tiempo necesario para la conducción de potenciales de acción desde el NRD a la CPFm es de  $25 \pm 3$  ms (latencia de los potenciales antidrómicos en el NRD inducidos por la estimulación de la CPFm; Hajós et al., 1998). Por lo tanto, **la latencia de las respuestas de inhibición pura** ( $10 \pm 1$  ms; o  $8 \pm 2$  ms en la fase de inhibición de las respuestas bifásicas) **observadas en IL durante la estimulación del NRD no pueden deberse a la coliberación de GABA por los axones 5-HT**, dado que, en ese caso, deberían ocurrir  $>25$  ms tras la estimulación del NRD.

En conjunto, estas observaciones apoyan la existencia de una proyección GABAérgica NRD-CPFm, mostrando inhibiciones de latencia corta en neuronas piramidales. En las condiciones experimentales utilizadas, este **componente GABAérgico parece ser más marcado en IL que en PrL**, tal y como se muestra en las latencias de respuestas de inhibición y bifásicas de menor magnitud en IL en comparación con PrL (López-Terrones et al., 2022). Sin embargo, son necesarios más estudios para examinar la conectividad exacta de las neuronas GABAérgicas de proyección del NRD con las subdivisiones de la CPFm, así como su papel en el tratamiento antidepresivo y en la función de la CPF.

Con respecto a las **respuestas excitatorias**, fueron mediadas por los **5-HT<sub>2A</sub>-R**, tal como se ha observado en estudios previos (Amargós-Bosch et al., 2004), aunque paradójicamente, la administración del antagonista de este receptor, M100907, aumentó la respuesta excitatoria en 3 de las 10 neuronas estudiadas. Este efecto posiblemente sea consecuencia del bloqueo de los 5-HT<sub>2A</sub>-R en interneuronas GABAérgicas (Santana et al., 2004) que controlan la actividad de las neuronas registradas. Esta interpretación está de acuerdo con estudios que muestran una acción preferentemente excitatoria del DOI (agonista 5-HT<sub>2A</sub>-R) sobre las neuronas piramidales de la CPFm (Puig et al., 2003; Wood et al., 2012), con un menor porcentaje de respuestas inhibitorias, siendo estas últimas bloqueadas tanto por M100907 (antagonista 5-HT<sub>2A</sub>-R) como por la picrotoxina (PIC), antagonista de los GABA<sub>A</sub>-R (Puig et al., 2003).



**Figura 20. Representación esquemática de la interacción recíproca entre la corteza prefrontal medial (CPFm) y el núcleo del rafe dorsal (NRD).** Representados 3 mecanismos responsables de la inhibición de las neuronas piramidales de la CPFm por la serotonina (5-HT) liberada por axones procedentes del NRD: **(A)** Activación directa del receptor 5-HT<sub>1A</sub> de neuronas piramidales; **(B)** activación del receptor 5-HT<sub>3</sub> de interneuronas GABAérgicas que controlan las aferencias talámicas de capa I alcanzando los penachos de las dendritas apicales y **(C)** activación de los receptores GABA<sub>A</sub> de neuronas piramidales por una vía GABAérgica directa procedente del NRD. **(D)** Las excitaciones estarían mediadas por la activación de los 5-HT<sub>2A</sub> presentes en las neuronas piramidales. En el esquema también se muestra un posible 4º mecanismo inhibitorio **(E)** que incluye

la activación de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> en interneuronas GABAérgicas locales y la consecuente inhibición de neuronas piramidales. Modificado de Artigas, 2015.

## Relevancia para el tratamiento antidepresivo

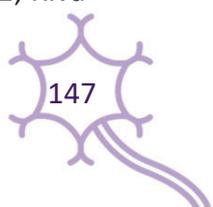
---

Tal y como se menciona en la introducción, la CCAv juega un papel principal en la fisiopatología y tratamiento del TDM. De igual modo, los datos obtenidos en roedores en los últimos años apoyan un papel clave de la corteza IL (y no de la PrL) en los comportamientos depresivo y antidepresivo. Dada su conectividad recíproca y control jerárquico de las áreas corticales y subcorticales por la CPF (incluyendo los núcleos monoaminérgicos del tronco encefálico (Gabbott et al., 2005; Groenewegen & Uylings, 2000), una **CCAv hiperactivada puede ejercer un excesivo control inhibitorio top-down de áreas subcorticales, dando lugar a la aparición de síntomas depresivos** (Artigas, 2021) (**Figura 21**). En concordancia con ello, datos recientes con roedores muestran que un marcado y persistente incremento de la neurotransmisión excitatoria en IL provoca un comportamiento depresivo en ratones, junto con una reducción en la función 5-HT y en la expresión de BDNF (Fullana et al. 2019a, 2019b, 2020). Del mismo modo, se asocia el comportamiento ansioso con el aumento de la actividad de neuronas piramidales de la corteza IL de ratón (Berg et al., 2019).

Así pues, **una reducción de la hiperactividad de la CCAv puede verse como una nueva diana terapéutica en el desarrollo de fármacos antidepresivos, puesto que ello normalizaría la actividad neuronal en las áreas subcorticales relevantes en el TDM que son inervadas por la CCAv**. En este sentido, diversos estudios de los últimos años parecen apoyar dichas ideas.

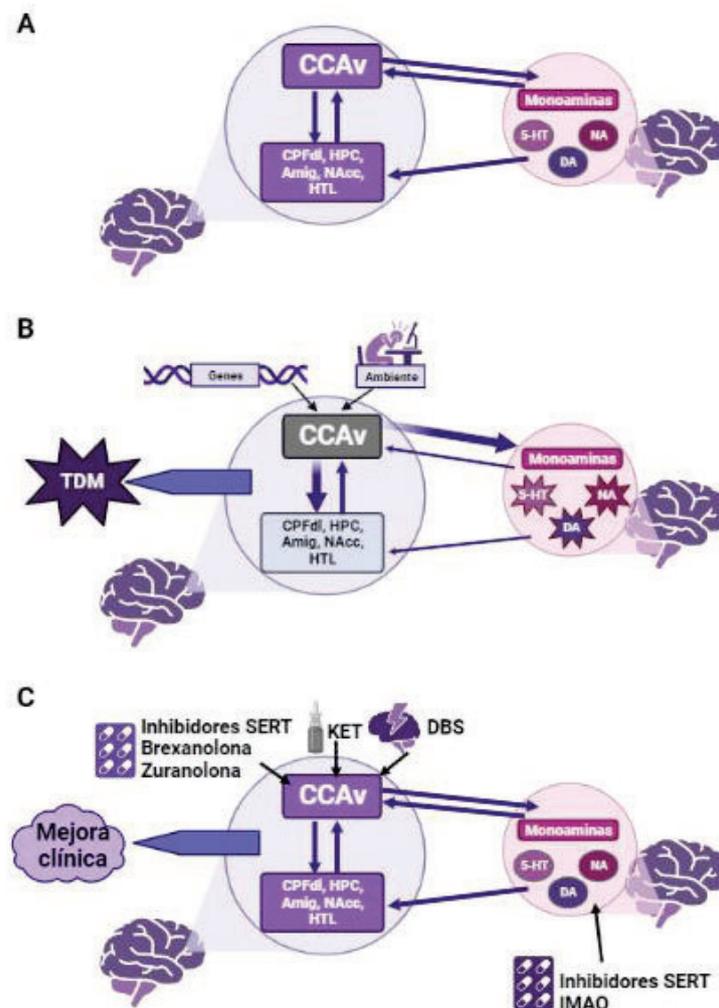
Así, el comportamiento depresivo mostrado por ratones con una hiperactividad glutamatérgica en IL (Fullana et al. 2019a, 2019b) se normalizó con un tratamiento agudo de citalopram y también de KET (ambos a 10 mg/Kg). En esta línea, resultados piloto obtenidos en esta tesis muestran como el **citalopram aumenta la acción inhibitoria de la estimulación del NRD en IL** (López-Terrones et al., 2022). En concordancia con estas observaciones, un reciente estudio revela que un tratamiento subcrónico (21 días) de **fluoxetina, reduce la actividad neuronal** basal de neuronas piramidales de la **CPFm en ratas** (Yin et al., 2021). Del mismo modo, la infusión intravenosa de **KET, atenuó la hiperactividad de la CCAv en pacientes con TDM** (Morris et al., 2020).

Por otra parte, **la DBS en la CCAv provoca efectos antidepresivos** en pacientes con TDM resistentes a los tratamientos convencionales (Mayberg et al., 2005; Puigdemont et al., 2012; Riva-



Posse et al., 2020). En rata, la **DBS en IL (pero no en PrL) provoca efectos antidepresivos** (Jiménez-Sánchez et al., 2016), apoyando la importancia de la corteza IL en modelos roedores de TDM.

De forma similar, la **activación de los 5-HT<sub>1A</sub>-R en la CPFm** por su agonista NLX-101 (el cuál actúa preferentemente en los 5-HT<sub>1A</sub>-R postsinápticos) produce **efectos antidepresivos en ratas** (Depoortère et al., 2021). Finalmente, y dado el notable papel de la neurotransmisión GABAérgica en las inhibiciones mediadas por el NRD, la **acción antidepresiva rápida de los moduladores alostéricos de los GABA<sub>A</sub>-R** como la brexanolona y SAGE-217 (Gunduz-Bruce et al., 2019; Kanés et al., 2017) podría explicarse, entre otras razones, por una **atenuación de la hiperactividad glutamatérgica de la CCAv a través del aumento de la función GABAérgica en esta área cortical.**

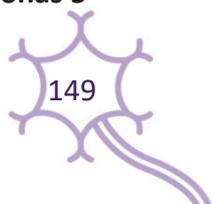


**Figura 21. A.** La corteza cingulada anterior ventral (CCAv) tiene una conexión recíproca con la mayoría de las áreas subcorticales, incluyendo los núcleos monoaminérgicos del tronco del encéfalo, así como áreas asociadas a la recompensa, áreas límbicas e hipotalámicas y ejerce un control jerárquico en su actividad. Por su parte, los núcleos monoaminérgicos proyectan extensamente al cerebro anterior, incluyendo áreas asociadas con la recompensa, áreas corticales, límbicas e hipotalámicas que también son inervadas por la CCAv (corteza infralímbica (IL) en roedores). **B.** Una combinación de genes y ambiente provoca la hiperactividad en la CCAv lo cual se traduce en una reducción en la actividad monoaminérgica global en áreas involucradas en el trastorno depresivo mayor (TDM), debido a la conectividad y control jerárquico que ejerce la CCAv sobre los sistemas monoaminérgicos, provocando de esta manera síntomas depresivos. **C.** La mejoría clínica respecto a síntomas depresivos puede ser el resultado de una actividad monoaminérgica restaurada (en particular de la actividad serotoninérgica (5-HT), a través de los fármacos que potencian la liberación de 5-HT), pero también de la atenuación de la hiperactividad glutamatérgica en la CCAv, a través de diferentes estrategias antidepressivas de acción rápida, una acción que reduciría el exceso control inhibitorio de los núcleos monoaminérgicos producido por la CCAv. Abreviaturas: CPFdl: corteza prefrontal dorsolateral; HPC: hipocampo; Amig: amígdala; NAcc: núcleo accumbens; HTL: hipotálamo; IMAO: inhibidores de la monoaminoxidasa; SERT: transportador de 5-HT; DA: dopamina; NA: noradrenalina; KET: ketamina; DBS: *deep brain stimulation* (estimulación cerebral profunda). Adaptado de Artigas, 2015.

## Control de la actividad serotoninérgica del NRD por la estimulación de las áreas PrL e IL de la CPFm (Trabajo 2)

En el trabajo 2, se estudió si las proyecciones de IL y PrL al NRD pueden provocar respuestas diferentes en las neuronas 5-HT, tal y como sugiere el distinto papel de ambas subdivisiones de la CPFm en el control emocional (ver Introducción). El estudio también fue impulsado por datos previos de nuestro laboratorio que indicaban que la estimulación aguda de AMPA-R en IL provocó una respuesta inmediata similar a la de un antidepressivo en ratas, asociada a un aumento de la liberación de 5-HT (Gasull-Camós et al., 2017, 2018). Sorprendentemente, ninguno de ambos efectos se produjo después de la activación de AMPA-R en PrL.

En un primer conjunto de datos, se ha observado que tanto **las estimulaciones eléctricas de IL como de PrL a baja frecuencia (0,9 Hz) indujeron un efecto inhibitor general sobre las neuronas 5-**



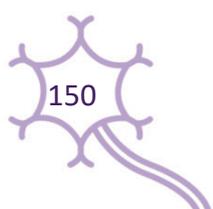
**HT del NRD.** Sin embargo, a **frecuencias más altas**, representativas de la actividad fásica de la CPFm, y también de la acción excitatoria de los receptores AMPA, se observaron diferencias regionales tras la estimulación de IL y PrL, con un **mayor porcentaje de neuronas 5-HT que respondieron después de la estimulación de IL que de PrL** (80 % frente a 64 % a 10 Hz; 86 % frente a 59 % a 20 Hz, respectivamente). Se observó también una diferencia regional, aunque menor, en el porcentaje de neuronas 5-HT inhibidas por la estimulación de IL o PrL (45 % frente a 27 % a 20 Hz, respectivamente). Por otra parte, **el efecto inhibitorio debido a la estimulación de IL a 20 Hz no parece estar mediado por la activación del autorreceptor 5-HT<sub>1A</sub>**, ya que no fue revertido por WAY-100635, sino por PIC, lo que indica la **participación de los GABA<sub>A</sub>-R locales en el control de la actividad de las neuronas 5-HT del NRD**, tal como se había observado con anterioridad a bajas frecuencias de estimulación (Celada et al., 2001; Varga et al., 2001).

Por otro lado, la **estimulación eléctrica y optogenética de ambas áreas aumentó la liberación de 5-HT en NRD, con un mayor efecto de IL versus PrL** en el control de la actividad 5-HT. Estos datos concuerdan con resultados previos del grupo que mostró que la estimulación eléctrica de la CPFm aumentó la liberación de 5-HT en el NRD (Celada et al., 2001). En el presente estudio hemos usado también técnicas optogenéticas que proporcionan un grado adicional de selectividad en el estudio de la vía CPFm-NRD. Curiosamente, tanto la estimulación eléctrica como la optogenética de IL indujeron un mayor aumento de la liberación de 5-HT en el NRD que la estimulación respectiva en PrL, lo que –unido a los datos sobre frecuencia de descarga- muestra por vez primera un control diferencial de la actividad 5-HT en el NRD por parte de IL y PrL. Dado el papel específico de IL (en roedores) y la CCAv (en humanos) en el control emocional y los trastornos del estado de ánimo, el trabajo 2 de la presente tesis mejora nuestra comprensión de los circuitos neuronales que subyacen a los trastornos del estado de ánimo.

## Modulación de la actividad de las neuronas 5-HT del NRD por la estimulación eléctrica de IL y PrL a distintas frecuencias

---

Curiosamente, **una proporción muy grande de neuronas 5-HT del NRD fue sensible a ambas zonas de estimulación** (91 % a IL, 87 % a PrL), lo que indica que ambas subdivisiones de la CPFm son áreas clave en el control de la actividad 5-HT. Esta gran proporción es consistente con la existencia de una gran cantidad de neuronas piramidales de la capa V que proyectan al NRD en ambas



subdivisiones de CPFm (Gabbott et al., 2005), aunque con distintas trayectorias hacia el NRD (Vertes, 2004).

En relación con lo anterior, evidencias electrofisiológicas previas demostraron que las neuronas piramidales de la CPFm podían activar o inhibir las neuronas 5-HT del NRD (Celada et al., 2001). Las **excitaciones** son monosinápticas e implican la activación de los **receptores AMPA y NMDA en las neuronas 5-HT**(Celada et al., 2001; Gartside et al., 2007), mientras que las **inhibiciones** están mediadas por dos mecanismos diferentes: **1)** Un *feedback* negativo local a través de los **autorreceptores 5-HT<sub>1A</sub>**, y **2)** La activación de las **interneuronas GABAérgicas** en el NRD por axones procedentes de la CPFm y la posterior inhibición de las neuronas 5-HT (Celada et al., 2001; Hajós et al., 1998; Srejjic et al., 2015; Varga et al., 2001). De acuerdo con estos estudios previos, encontramos que **la estimulación de IL y PrL a una frecuencia baja (0,9 Hz) inhibía una proporción similar de neuronas 5-HT del NRD** (53 % a IL, 48 % a PrL).

En el primer grupo de experimentos, la misma neurona 5-HT se estimuló dos veces (IL-PrL o PrL-IL, mismo hemisferio) con un período de 2 minutos entre cada estimulación. Sorprendentemente, la segunda estimulación (ya fuera desde IL o PrL) indujo un patrón de respuesta completamente diferente, dejando **casi la mitad de las neuronas registradas insensibles a la segunda estimulación**. Esta respuesta diferencial a la segunda zona de estimulación no parece ser un artefacto experimental ya que la respuesta se mantuvo después de una segunda estimulación desde el mismo lugar de estimulación (ya fuera IL o PrL). Aunque carecemos de una explicación definitiva, la falta de respuesta a la segunda estimulación podría deberse a la existencia de un circuito intrínseco entre IL y PrL. La evidencia anatómica(Hoover & Vertes, 2007) y electrofisiológica (Ji & Neugebauer, 2012; van Aerde et al., 2008) sugiere una **interacción significativa entre IL y PrL**. Del mismo modo, IL y PrL presentan una conectividad recíproca en capas V-VI (Marek et al., 2018; Mukherjee & Caroni, 2018; Watanabe et al., 2021) y la activación óptica de **las neuronas piramidales de IL inhibe las células piramidales de PrL**, lo que indica que las proyecciones de IL controlan las proyecciones de PrL (Ji & Neugebauer, 2012). Asimismo, la desconexión de IL y PrL interrumpe los ritmos neuronales dentro de la CPFm (van Aerde et al., 2008) y se ha observado una mayor sincronía interregional entre IL y PrL durante la extinción del miedo (Watanabe et al., 2021).

En conjunto, estos datos nos indican **la existencia de un sistema complejo basado en circuitos dentro del CPF que puede afectar la actividad de las neuronas de la capa V que proyectan al NRD**. Sin embargo, son necesarios más estudios para esclarecer los mecanismos precisos del circuito.

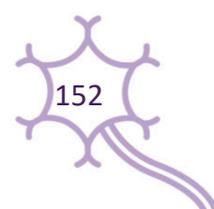
Un hallazgo clave de este trabajo es que **IL y PrL ejercieron un control diferente sobre actividad 5-HT del NRD solo cuando fueron estimuladas a frecuencias más altas (10-20 Hz)**, representativas de la actividad fásica de la CPFm y de la estimulación glutamatérgica (p. ej. activación de AMPA-R; Gasull-Camós et al., 2017). Tal y como se resumió anteriormente, la **estimulación de IL a 10 y 20 Hz moduló significativamente la actividad de más neuronas 5-HT del NRD que la estimulación de PrL a las mismas frecuencias (80 % frente a 64 % a 10 Hz; 86 % frente a 59 % a 20 Hz, respectivamente)**.

## Receptores involucrados en la modulación de la actividad 5-HT por la estimulación de IL y PrL a 20 Hz

---

Curiosamente, los mecanismos involucrados en el control de las neuronas 5-HT del NRD por IL y PrL parecen diferir, con una **participación más marcada de las neuronas GABAérgicas del NRD en el caso de IL**, como sugiere su sensibilidad a PIC (antagonista GABA<sub>A</sub>-R). Por lo tanto, además de las conexiones excitatorias directas con las neuronas 5-HT (Celada et al., 2001), las **neuronas piramidales de IL que proyectan al NRD se dirigirían preferentemente (en comparación con las neuronas piramidales de PrL) a las interneuronas GABAérgicas del NRD** (Celada et al., 2001; Varga et al., 2001; Weissbourd et al., 2014). Esta opinión también es coherente con estudios previos que demuestran cómo la estimulación a alta frecuencia (*high frequency stimulation*; HFS) de la IL induce un efecto preferentemente inhibitorio en las neuronas del NRD; el cual está mediado por los receptores GABA<sub>A</sub> (Srejjic et al., 2015, 2016). Del mismo modo, la administración intra-NRD de antagonistas de GABA aumentó la activación de neuronas 5-HT y liberación de 5-HT (Bagdy et al., 2000; Levine & Jacobs, 1992).

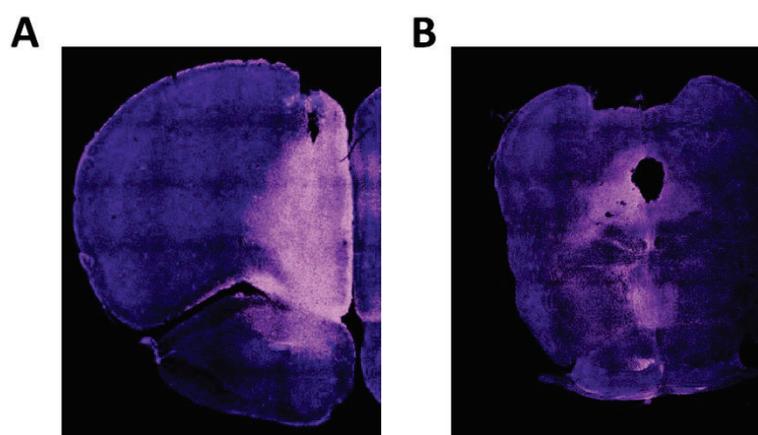
Sin embargo, **el antagonismo del 5-HT<sub>1A</sub>-R por WAY-100635 no pudo aumentar el efecto de la estimulación de IL y PrL sobre la actividad 5-HT del NRD**. Este resultado fue totalmente inesperado, dado el marcado papel de los mecanismos de autoinhibición mediados por los autorreceptores 5-HT<sub>1A</sub> en el control de la actividad neuronal del NRD y la liberación de 5-HT (Artigas et al., 2001; Celada et al., 2001; Sharp et al., 1993). Asimismo, la estimulación a baja frecuencia de la CPFm inhibe, según estudios previos, una gran proporción de neuronas 5-HT del NRD a través de la activación del



autorreceptor 5-HT<sub>1A</sub> (Celada et al., 2001). Los presentes resultados pueden indicar que la **estimulación a tasas más altas superaría los mecanismos de autoinhibición mediados por los autorreceptores 5-HT<sub>1A</sub> al aumentar la relación excitación/inhibición dentro del NRD**. Esta es una observación importante en el campo de los antidepresivos, ya que la autoinhibición a través de los **autorreceptores 5-HT<sub>1A</sub> es el principal mecanismo presináptico implicado en el retraso de la acción terapéutica de los fármacos antidepresivos convencionales**, basados en la inhibición del transportador de 5-HT (Artigas et al., 1996).

## Modulación diferencial de la liberación de 5-HT en el NRD por la estimulación de IL y PrL

El papel diferencial de IL y PrL en el control de la actividad 5-HT del NRD ha sido reforzado a través del grupo de experimentos de microdiálisis *in vivo* durante la estimulación **eléctrica y optogenética** de IL y PrL. Los resultados mostraron que la **estimulación de ambas áreas aumentó la liberación de 5-HT en el NRD, con un aumento significativamente mayor de la liberación de 5-HT en el NRD después de la estimulación de IL**. En el caso de la estimulación optogenética, cabe destacar que la expresión de ChR2 inducida por el vector viral en neuronas piramidales de IL y PrL se tradujo en una alta expresión de ChR2 en zonas terminales dentro del NRD (**ver Figura 22**). Esta observación confirmó la correcta infección del virus adeno-asociado (AAV) y refuerza aún más la idea que IL y PrL son áreas clave en el control de la actividad 5-HT.



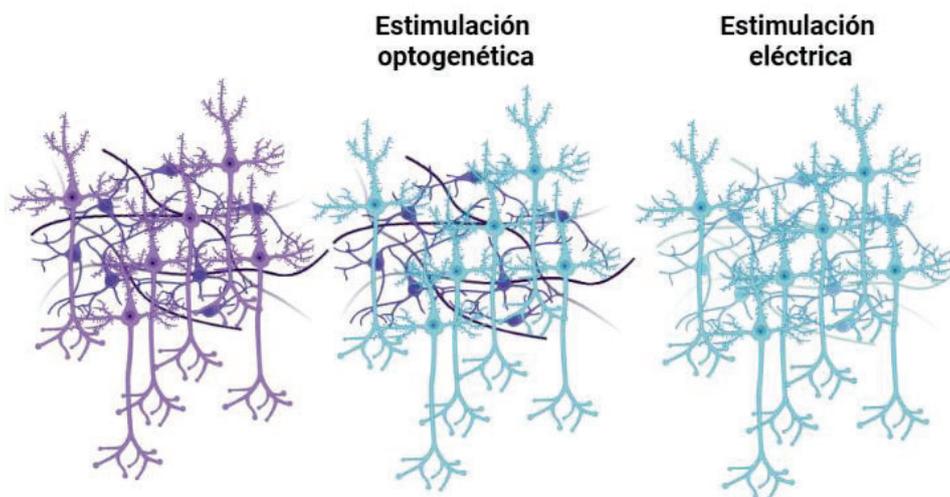
**Figura 22. Cortes coronales de cerebro de rata representativos realizados mediante microscopía confocal donde se aprecia el virus adeno-asociado (AAV) en color fluorescente. A. Corte coronal al nivel del sitio de inyección del AAV (Corteza prefrontal medial; CPFm). B. Corte coronal al nivel del sitio donde se colocó la**

sonda de microdiálisis en los experimentos (Núcleo del rafe dorsal; NRD). Nótese la intensidad fluorescente en el NRD, indicando el transporte exitoso del AAV por los axones descendientes desde la CPFm hasta el NRD.

Este hallazgo se suma a los datos previos que confirman un papel relevante de la corteza IL en los trastornos del estado de ánimo y el tratamiento antidepresivo (Fuchikami et al., 2015; Fullana et al., 2019b; Fullana, Gasull-Camós et al., 2020; Garro-Martínez et al., 2021; Gasull-Camós et al., 2017; Jiménez-Sánchez et al., 2016; López-Terrones et al., 2022). En particular, estos datos concuerdan con datos previos que muestran que la **activación de AMPA-R en IL (pero no en PrL) provocó efectos similares a los antidepresivos rápidos y robustos en ratas, dependiendo de la activación de vías excitatorias que proyectan al NRD y el posterior aumento de la neurotransmisión serotoninérgica** (Gasull-Camós et al., 2017, 2018).

Cabe destacar que el **aumento de la liberación de 5-HT en el NRD inducido por estímulos eléctricos y optogénéticos persistió tras el cese de la estimulación y aumentó con el tiempo**. Dicho efecto es similar al observado tras registrar las neuronas 5-HT del NRD antes, durante y después de la estimulación a alta frecuencia de IL (Lim et al., 2015). Aunque los mecanismos involucrados en este efecto son todavía desconocidos, presentan una clara similitud con fenómenos de potenciación a largo plazo (*long-term potentiation*; LTP), coherentes con la activación de NMDA-R por la vía CPFm-NRD (Celada et al., 2001) y descritos anteriormente en neuronas 5-HT del NRD (Haj-Dahmane et al., 2017).

**La liberación de 5-HT en el NRD fue mayor durante la estimulación eléctrica que la óptica tanto en IL como en PrL**, diferencia muy posiblemente debida a la mayor selectividad de la estimulación optogénética. Así, la estimulación eléctrica activa de manera inespecífica múltiples tipos de neuronas cerca de la zona del implante, mientras que la optogénética permite la activación directa y selectiva de las neuronas piramidales (las interneuronas no expresan CamKII) en el área estimulada (**Figura 23**). Así pues, la estimulación de las neuronas piramidales en IL y PrL que proyectan a otras regiones del cerebro, las cuales a su vez conectan con el NRD y modulan la actividad de las neuronas 5-HT (p. ej., hipotálamo lateral, área tegmental ventral, locus coeruleus, etc.) (Gabbott et al., 2005) pueden explicar en parte las diferencias observadas.



**Figura 23. Estimulación optogenética versus estimulación eléctrica.** En la primera imagen se muestran neuronas en la corteza prefrontal (CPF) sin ningún tipo de estimulación artificial (color morado). Con la estimulación optogenética, tras la aplicación del láser en un área restringida, se activan (color azul) de manera específica las neuronas piramidales de la CPF, dejando sin estimular el resto de tipos neuronales (color morado). Sin embargo, al aplicar estimulación eléctrica, se estimulan (color azul) todos los tipos neuronales presentes en la zona de estimulación.

En conjunto, este trabajo enfatiza la **distinta contribución de las cortezas IL y PrL en la modulación de la actividad 5-HT**. Además, las diferencias más destacables se han encontrado cuando las estimulaciones se hicieron a frecuencias más altas, representativas de la actividad fásica de la CPFm y de la estimulación por agentes glutamatérgicos involucrados en las acciones antidepresivas rápidas. En conclusión, la **corteza IL influye en mayor medida que la PrL en la modulación de la actividad 5-HT del NRD**, lo cual es consistente con sus proyecciones de mayor densidad hacia el NRD, en comparación con el área PrL (Vertes, 2004). Dado el papel clave que ejerce la 5-HT en el tratamiento del TDM, y el de la CCAv (en humanos) y la IL (en roedores) en el TDM y estrategias antidepresivas, estos datos pueden ser de gran ayuda para clarificar los circuitos neuronales involucrados en estos procesos.

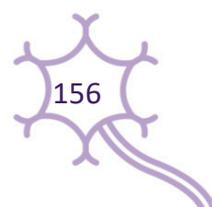
# Diferente expresión del 5-HT<sub>2B</sub>-R en el NRD de rata y ratón (Trabajo 3)

A pesar de que los datos del trabajo 2 concuerdan con datos previos observados en rata (Gasull-Camós et al., 2017, 2018), (tal y como se ha mencionado en el apartado anterior), **estudios análogos en ratón muestran resultados opuestos** (Fullana, Gasull-Camós et al 2019b, 2020). Así, se observó que la administración de un siRNA dirigido contra los transportadores de glutamato GLT-1 y GLAST en IL, y su consecuente hiperactivación glutamatérgica persistente, producía una disminución en la liberación de 5-HT y los ratones mostraban un fenotipo depresivo (Fullana et al., 2019b). Del mismo modo que en el estudio realizado en ratas de Gasull-Camós et al (2017), cuando el bloqueo de GLT-1 y GLAST se realizó en PrL, no se observó ningún efecto, ni a nivel fenotípico ni en lo referente a la liberación de 5-HT (Fullana et al., 2019b).

Las razones de esta gran diferencia entre ambos estudios son todavía mal conocidas, y pueden incluir, por ejemplo, el distinto patrón temporal de activación glutamatérgica (aguda en rata, persistente en ratón). Sin embargo, los resultados del trabajo 3 de la presente tesis aportan nueva luz a las **diferencias interespecie que pueden contribuir a las diferencias observadas**.

En el trabajo 3, usando inmunohistoquímica y microdiálisis *in vivo* y se muestra por primera vez la existencia de **diferencias anatomo-funcionales del 5-HT<sub>2B</sub>-R entre el NRD de rata y ratón**. Dicho receptor es uno de los receptores 5-HT poco conocidos en SNC, a pesar de jugar un papel fundamental en el sistema cardio-vascular (Kaumann & Levy, 2006), entre otros, y hasta muy recientemente no se han obtenidos anticuerpos selectivos que permitan caracterizar la presencia de dicho receptor en cerebro. Estudios de los grupos de U. Spampinato (Univ. Bordeaux) –con quien nuestro grupo ha colaborado frecuentemente- y L. Maroteaux (INSERM, Paris) en rata y ratón, respectivamente, muestran resultados opuestos en cuanto al control de la actividad y liberación de 5-HT por parte de los 5-HT<sub>2B</sub>-R (descrito en Cathala et al., 2022), lo que llevó a estudiar la expresión de 5-HT<sub>2B</sub>-R en neuronas 5-HT y GABA del NRD.

En particular, al estudiar las diversas subregiones del NRD (NRDd, NRDv y NRDI), la principal diferencia observada entre las dos especies se encontró en el NRDI. De hecho, se observó que, en el **NRDI de rata, los 5-HT<sub>2B</sub>-R se expresan principalmente en un subgrupo de neuronas 5-HT que contienen GAD67, mientras que, en el NRDI de ratón, los 5-HT<sub>2B</sub>-R se expresan principalmente en**



**células positivas para TPH2, sin GAD67.** El porcentaje de neuronas 5-HT –sin GAD67- que expresan el 5-HT<sub>2B</sub>-R en ratón es más del triple que en rata, mientras que la proporción de neuronas 5-HT +GAD67 que lo expresan es unas 5 veces superior en rata que en ratón.

En consonancia con la distinta expresión del 5-HT<sub>2B</sub>-R en los distintos tipos neuronales en el NRD de rata y ratón, la **administración intra-NRD de BW 723C86** (agonista de 5-HT<sub>2B</sub>-R) **disminuyó la liberación de 5-HT en el NRD de ratas** y, sin embargo, **aumentó su liberación en el NRD de ratones**, siendo bloqueados estos efectos por la administración local de RS 127445 (antagonista de 5-HT<sub>2B</sub>-R).

En conjunto, estos resultados indican la existencia de diferencias anatómicas en la expresión celular de 5-HT<sub>2B</sub>-R en el NRD de rata y ratón, lo cual se traduce en una **influencia opuesta en la activación de neuronas 5-HT y en la liberación de 5-HT**. Además, destacan la relevancia del subconjunto de neuronas 5-HT positivas para GAD67 en la modulación diferencial de la actividad neuronal 5-HT en ratas y ratones.

De este modo, **la activación de las fibras procedentes de la CPF podría regular de manera distinta la actividad del NRD de ambas especies mediante un balance excitación/inhibición diferente en rata y ratón.**



# Conclusiones



1. Las **neuronas piramidales de la IL poseen una mayor sensibilidad que las de PrL a la neurotransmisión serotoninérgica**. Así, la gran mayoría (84%) son sensibles a la estimulación del NRD, mientras que solo lo son un 64% de las de PrL. Además, las **neuronas piramidales de IL presentan un mayor porcentaje de respuestas inhibitorias** (64% vs. 36% en IL y PrL, respectivamente), lo que hace de esta zona cortical un **área especialmente sensible a las acciones inhibitorias de la 5-HT**.
2. Las **respuestas inhibitorias implican, al menos, 3 mecanismos distintos**, mediados por **5-HT<sub>1A</sub>-R y GABA<sub>A</sub>-R piramidales y por 5-HT<sub>3</sub>-R expresados en interneuronas GABAérgicas**. Además, hemos encontrado evidencias de un cuarto mecanismo (activación de 5-HT<sub>2A</sub>-R en interneuronas GABAérgicas) que precisa de una mejor caracterización. En cambio, las **respuestas excitatorias** inducidas por 5-HT en ambas áreas corticales están **mediadas por los 5-HT<sub>2A</sub>-R expresados en las propias neuronas piramidales**.
3. Dada la existencia de una hiperactivación glutamatérgica en la CCAv de pacientes con TDM (y en la corteza IL de modelos animales de TDM), **los antidepresivos con acción serotoninérgica como los ISRS, IRSN, etc., podrían ejercer parte de su acción terapéutica a través de la normalización del balance excitación/inhibición excesivo, a través de un aumento de las acciones inhibitorias de 5-HT en esta área cortical**.
4. La CPF, y en particular **IL y PrL son áreas clave en el control de la actividad serotoninérgica**, ya que **la mayor parte de las neuronas 5-HT del NRD son sensibles a la estimulación de IL y PrL a baja frecuencia** (92% y 89%, respectivamente). Ello indica -junto a los resultados en los que se basa la 1ª conclusión - **que la actividad de la PCF y el NRD están íntimamente relacionadas, con un control inhibitorio mutuo que puede afectar la función neuronal en muchas otras áreas cerebrales**, dadas las múltiples proyecciones de ambas estructuras a otras áreas corticales y subcorticales.

5. **IL y PrL controlan de forma diferencial la actividad de las neuronas 5-HT del NRD, con una mayor magnitud en el caso de IL.** Así, la estimulación de **IL a frecuencias altas (10 y 20 Hz), modificó la actividad de una mayor proporción de neuronas 5-HT del NRD** que la estimulación de PrL a las mismas frecuencias (80 % frente a 64 % a 10 Hz; 86 % frente a 59 % a 20 Hz, respectivamente). Asimismo, la estimulación eléctrica y optogenética de **ambas áreas aumento en la liberación de 5-HT** en el NRD, siendo dicho aumento significativamente **mayor tras la estimulación de IL.** Finalmente, los **mecanismos involucrados** parecen ser distintos, con una **mayor participación de las neuronas GABAérgicas del NRD en el caso de IL.**
6. La activación de fibras procedentes de **la CPF podría regular de manera distinta la actividad del NRD de rata y ratón debido a un balance excitación/inhibición diferente,** ya que en rata los 5-HT<sub>2B</sub>-R excitatorios se expresan principalmente en un subgrupo de neuronas 5-HT que contienen GAD67, mientras que, en el ratón, los 5-HT<sub>2B</sub>-R se expresan principalmente en células positivas para TPH2. Dicha diferencia es particularmente notable en la zona lateral del NRD.

# REFERENCIAS

- Adell, A., & Artigas, F. (1991). Differential effects of clomipramine given locally or systemically on extracellular 5-hydroxytryptamine in raphe nuclei and frontal cortex. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 343(3). <https://doi.org/10.1007/BF00251121>
- Allers, K. A., & Sharp, T. (2003). Neurochemical and anatomical identification of fast- and slow-firing neurones in the rat dorsal raphe nucleus using juxtacellular labelling methods in vivo. *Neuroscience*, 122(1), 193–204. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(03\)00518-9](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(03)00518-9)
- Althaus, A. L., Ackley, M. A., Belfort, G. M., Gee, S. M., Dai, J., Nguyen, D. P., Kazdoba, T. M., Modgil, A., Davies, P. A., Moss, S. J., Salituro, F. G., Hoffmann, E., Hammond, R. S., Robichaud, A. J., Quirk, M. C., & Doherty, J. J. (2020). Preclinical characterization of zuranolone (SAGE-217), a selective neuroactive steroid GABAA receptor positive allosteric modulator. *Neuropharmacology*, 181, 108333. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108333>
- Amargós-Bosch, M., Bortolozzi, A., Puig, M. V., Serrats, J., Adell, A., Celada, P., Toth, M., Mengod, G., & Artigas, F. (2004). Co-expression and In Vivo Interaction of Serotonin1A and Serotonin2A Receptors in Pyramidal Neurons of Pre-frontal Cortex. *Cerebral Cortex*, 14(3), 281–299. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhg128>
- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5)* (American Psychiatric Publishing, Ed.; 5th ed.).
- Ancelin, M.-L., Carrière, I., Artero, S., Maller, J., Meslin, C., Ritchie, K., Ryan, J., & Chaudieu, I. (2019). Lifetime major depression and grey-matter volume. *Journal of Psychiatry & Neuroscience*, 44(1), 45–53. <https://doi.org/10.1503/jpn.180026>
- Anderson, I. M. (2000). Selective serotonin reuptake inhibitors versus tricyclic antidepressants: a meta-analysis of efficacy and tolerability. *Journal of Affective Disorders*, 58(1), 19–36. [https://doi.org/10.1016/S0165-0327\(99\)00092-0](https://doi.org/10.1016/S0165-0327(99)00092-0)
- Arana, G. W., Baldessarini, R. J., Ornstein, M., Center, M. R., Hospital, M., & Belmont, J. (1985). The Dexamethasone Suppression Test for Diagnosis and Prognosis in Psychiatry Commentary and Review. *Arch Gen Psychiatry*, 42, 1193–1204. <http://archpsyc.jamanetwork.com/>
- Araneda, R., & Andrade, R. (1991). 5-Hydroxytryptamine<sub>2</sub> and 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptors mediate opposing responses on membrane excitability in rat association cortex. *Neuroscience*, 40(2), 399–412. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(91\)90128-B](https://doi.org/10.1016/0306-4522(91)90128-B)
- Artigas, F. (2013). Serotonin receptors involved in antidepressant effects. *Pharmacology & Therapeutics*, 137(1), 119–131. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.09.006>
- Artigas, F. (2015). Developments in the field of antidepressants, where do we go now? *European Neuropsychopharmacology*, 25(5), 657–670. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2013.04.013>
- Artigas, F. (2021). Brain circuitry in major depressive disorder: The critical role of ventral anterior cingulate cortex. *European Neuropsychopharmacology*, 51, 134–137. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2021.07.001>
- Artigas, F., Bortolozzi, A., & Celada, P. (2018). Can we increase speed and efficacy of antidepressant treatments? Part I: General aspects and monoamine-based strategies. *European Neuropsychopharmacology*, 28(4), 445–456. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2017.10.032>
- Artigas, F., Celada, P., Laruelle, M., & Adell, A. (2001). How does pindolol improve antidepressant action? *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(5), 224–228. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)01682-5](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01682-5)

- Artigas, F., Romero, L., de Montigny, C., & Blier, P. (1996). Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT<sub>1A</sub> antagonists. *Trends in Neurosciences*, *19*(9), 378–383. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(96\)10037-0](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(96)10037-0)
- Ashby, C. R., Edwards, E., Harkins, K., & Wang, R. Y. (1989). Characterization of 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptors in the medial prefrontal cortex: a microiontophoretic study. *European Journal of Pharmacology*, *173*, 193–196.
- Ashby, C. R., Edwards, E., & Wang, R. Y. (1992). Action of serotonin in the medial prefrontal cortex: Mediation by serotonin<sub>3</sub>-like receptors. *Synapse*, *10*(1), 7–15. <https://doi.org/10.1002/syn.890100103>
- Ashby, C. R., Edwards, E., & Wang, R. Y. (1994). Electrophysiological evidence for a functional interaction between 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the rat medial prefrontal cortex: An iontophoretic study. *Synapse*, *17*(3), 173–181. <https://doi.org/10.1002/syn.890170306>
- Ashby, C. R., Jiang, L. H., Kasser, R. J., & Wang, R. Y. (1990). Electrophysiological characterization of 5-hydroxytryptamine<sub>2</sub> receptors in the rat medial prefrontal cortex. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *252*(1), 171–178.
- Ashby, C. R., Minabe, Y., Edwards, E., & Wang, R. Y. (1991). 5-HT<sub>3</sub>-like receptors in the rat medial prefrontal cortex: an electrophysiological study. *Brain Research*, *550*(2), 181–191. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91316-S](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91316-S)
- Atlas, L. Y., & Wager, T. D. (2014). *A Meta-analysis of Brain Mechanisms of Placebo Analgesia: Consistent Findings and Unanswered Questions* (pp. 37–69). [https://doi.org/10.1007/978-3-662-44519-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-662-44519-8_3)
- Bagdy, E., Kiraly, I., & Harsing, L. G. (2000). Reciprocal innervation between serotonergic and GABAergic neurons in raphe nuclei of the rat. *Neurochemical Research*, *25*(11), 1465–1473. <https://doi.org/10.1023/a:1007672008297>
- Bair, M. J., Robinson, R. L., Katon, W., & Kroenke, K. (2003). Depression and pain comorbidity: a literature review. *Archives of Internal Medicine*, *163*(20), 2433–2445. <https://doi.org/10.1001/archinte.163.20.2433>
- Baker, G. B., Coutts, R. T., McKenna, K. F., & Sherry-McKenna, R. L. (1992). Insights into the mechanisms of action of the MAO inhibitors phenelzine and tranylcypromine: a review. *Journal of Psychiatry & Neuroscience : JPN*, *17*(5), 206–214.
- Baker, K. G., Halliday, G. M., & Törk, I. (1990). Cytoarchitecture of the human dorsal raphe nucleus. *Journal of Comparative Neurology*, *301*(2), 147–161. <https://doi.org/10.1002/cne.903010202>
- Bang, S. J., & Commons, K. G. (2012a). Forebrain GABAergic projections from the dorsal raphe nucleus identified by using GAD67-GFP knock-in mice. *The Journal of Comparative Neurology*, *520*(18), 4157–4167. <https://doi.org/10.1002/cne.23146>
- Bang, S. J., & Commons, K. G. (2012b). Forebrain GABAergic projections from the dorsal raphe nucleus identified by using GAD67-GFP knock-in mice. *The Journal of Comparative Neurology*, *520*(18), 4157–4167. <https://doi.org/10.1002/cne.23146>
- Beck, S. G., Pan, Y.-Z., Akanwa, A. C., & Kirby, L. G. (2004). Median and Dorsal Raphe Neurons Are Not Electrophysiologically Identical. *Journal of Neurophysiology*, *91*(2), 994–1005. <https://doi.org/10.1152/jn.00744.2003>
- Béïque, J.-C., Campbell, B., Perring, P., Hamblin, M. W., Walker, P., Mladenovic, L., & Andrade, R. (2004). Serotonergic regulation of membrane potential in developing rat prefrontal cortex: coordinated expression of 5-hydroxytryptamine (5-HT)<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, and 5-HT<sub>7</sub> receptors. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *24*(20), 4807–4817. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5113-03.2004>
- Bel, N., & Artigas, F. (1992). Fluvoxamine preferentially increases extracellular 5-hydroxytryptamine in the raphe nuclei: An in vivo microdialysis study. *European Journal of Pharmacology*, *229*(1), 101–103. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(92\)90292-C](https://doi.org/10.1016/0014-2999(92)90292-C)
- Bel, N., & Artigas, F. (1993). Chronic treatment with fluvoxamine increases extracellular serotonin in frontal cortex but not in raphe nuclei. *Synapse*, *15*(3), 243–245. <https://doi.org/10.1002/syn.890150310>

- Belmer, A., Quentin, E., Diaz, S. L., Guiard, B. P., Fernandez, S. P., Doly, S., Banas, S. M., Pitychoutis, P. M., Moutkine, I., Muzerelle, A., Tchenio, A., Roumier, A., Mameli, M., & Maroteaux, L. (2018). Positive regulation of raphe serotonin neurons by serotonin 2B receptors. *Neuropsychopharmacology*, *43*(7), 1623–1632. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0013-0>
- Belvederi Murri, M., Prestia, D., Mondelli, V., Pariante, C., Patti, S., Olivieri, B., Arzani, C., Masotti, M., Respino, M., Antonioli, M., Vassallo, L., Serafini, G., Perna, G., Pompili, M., & Amore, M. (2016). The HPA axis in bipolar disorder: Systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*, *63*, 327–342. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.10.014>
- Berg, L., Eckardt, J., & Masseck, O. A. (2019). Enhanced activity of pyramidal neurons in the infralimbic cortex drives anxiety behavior. *PLOS ONE*, *14*(1), e0210949. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210949>
- Berlin, H. A., Rolls, E. T., & Kischka, U. (2004). Impulsivity, time perception, emotion and reinforcement sensitivity in patients with orbitofrontal cortex lesions. *Brain*, *127*(5), 1108–1126. <https://doi.org/10.1093/brain/awh135>
- Berman, R. M., Cappiello, A., Anand, A., Oren, D. A., Heninger, G. R., Charney, D. S., & Krystal, J. H. (2000). Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biological Psychiatry*, *47*(4), 351–354. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(99\)00230-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(99)00230-9)
- Bet, P. M., Hugtenburg, J. G., Penninx, B. W. J. H., & Hoogendijk, W. J. G. (2013). Side effects of antidepressants during long-term use in a naturalistic setting. *European Neuropsychopharmacology*, *23*(11), 1443–1451. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2013.05.001>
- Beurel, E., Toups, M., & Nemeroff, C. B. (2020). The Bidirectional Relationship of Depression and Inflammation: Double Trouble. *Neuron*, *107*(2), 234–256. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.06.002>
- Biver, F., Goldman, S., Delvenne, V., Luxen, A., de Maertelaer, V., Hubain, P., Mendlewicz, J., & Lotstra, F. (1994). Frontal and parietal metabolic disturbances in unipolar depression. *Biological Psychiatry*, *36*(6), 381–388. [https://doi.org/10.1016/0006-3223\(94\)91213-0](https://doi.org/10.1016/0006-3223(94)91213-0)
- Blier, P., & de Montigny, C. (1994). Current advances and trends in the treatment of depression. *Trends in Pharmacological Sciences*, *15*(7), 220–226. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(94\)90315-8](https://doi.org/10.1016/0165-6147(94)90315-8)
- Boku, S., Nakagawa, S., Toda, H., & Hishimoto, A. (2018). Neural basis of major depressive disorder: Beyond monoamine hypothesis. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, *72*(1), 3–12. <https://doi.org/10.1111/pcn.12604>
- Bora, E., Fornito, A., Pantelis, C., & Yücel, M. (2012). Gray matter abnormalities in Major Depressive Disorder: A meta-analysis of voxel based morphometry studies. *Journal of Affective Disorders*, *138*(1–2), 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2011.03.049>
- Botteron, K. N., Raichle, M. E., Drevets, W. C., Heath, A. C., & Todd, R. D. (2002). Volumetric reduction in left subgenual prefrontal cortex in early onset depression. *Biological Psychiatry*, *51*(4), 342–344. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(01\)01280-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(01)01280-X)
- Branchereau, P., van Bockstaele, E. J., Chan, J., & Pickel, V. M. (1996). Pyramidal neurons in rat prefrontal cortex show a complex synaptic response to single electrical stimulation of the locus coeruleus region: Evidence for antidromic activation and GABAergic inhibition using in vivo intracellular recording and electron microscopy. *Synapse*, *22*(4), 313–331. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2396\(199604\)22:4<313::AID-SYN3>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2396(199604)22:4<313::AID-SYN3>3.0.CO;2-E)
- Bremner, J. D., Vythilingam, M., Vermetten, E., Nazeer, A., Adil, J., Khan, S., Staib, L. H., & Charney, D. S. (2002). Reduced volume of orbitofrontal cortex in major depression. *Biological Psychiatry*, *51*(4), 273–279. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(01\)01336-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(01)01336-1)
- Calizo, L. H., Akanwa, A., Ma, X., Pan, Y., Lemos, J. C., Craige, C., Heemstra, L. A., & Beck, S. G. (2011). Raphe serotonin neurons are not homogenous: Electrophysiological, morphological and neurochemical evidence. *Neuropharmacology*, *61*(3), 524–543. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.04.008>

- Cao, D., Li, Y., & Tang, Y. (2021). Functional specificity of the left ventrolateral prefrontal cortex in positive reappraisal: A single-pulse transcranial magnetic stimulation study. *Cognitive, Affective, & Behavioral Neuroscience*, 21, 793–804. <https://doi.org/10.3758/s13415-021-00881-1/Published>
- Caraci, F., Copani, A., Nicoletti, F., & Drago, F. (2010). Depression and Alzheimer's disease: neurobiological links and common pharmacological targets. *European Journal of Pharmacology*, 626(1), 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.10.022>
- Carlén, M. (2017). What constitutes the prefrontal cortex? *Science*, 358(6362), 478–482. <http://science.sciencemag.org/>
- Carr, D. B., & Sesack, S. R. (2000). GABA-containing neurons in the rat ventral tegmental area project to the prefrontal cortex. *Synapse (New York, N.Y.)*, 38(2), 114–123. [https://doi.org/10.1002/1098-2396\(200011\)38:2<114::AID-SYN2>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1098-2396(200011)38:2<114::AID-SYN2>3.0.CO;2-R)
- Carvalho, A. F., Cavalcante, J. L., Castelo, M. S., & Lima, M. C. O. (2007). Augmentation strategies for treatment-resistant depression: a literature review. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 32(5), 415–428. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2710.2007.00846.x>
- Caspi, A., Sugden, K., Moffitt, T. E., Taylor, A., Craig, I. W., Harrington, H. L., McClay, J., Mill, J., Martin, J., Braithwaite, A., & Poulton, R. (2003). Influence of life stress on depression: Moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science*, 301(5631), 386–389. <https://doi.org/10.1126/science.1083968>
- Cathala, A., Devroye, C., Drutel, G., Revest, J.-M., Artigas, F., & Spampinato, U. (2019). Serotonin2B receptors in the rat dorsal raphe nucleus exert a GABA-mediated tonic inhibitory control on serotonin neurons. *Experimental Neurology*, 311, 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.09.015>
- Cathala, A., Lucas, G., López-Terrones, E., Revest, J.-M., Artigas, F., & Spampinato, U. (2022). Differential expression of serotonin2B receptors in GABAergic and serotonergic neurons of the rat and mouse dorsal raphe nucleus. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 121, 103750. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2022.103750>
- Celada, P., & Artigas, F. (1993). Monoamine oxidase inhibitors increase preferentially extracellular 5-hydroxytryptamine in the midbrain raphe nuclei. A brain microdialysis study in the awake rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 347(6), 583–590. <https://doi.org/10.1007/BF00166940>
- Celada, P., Puig, M. V., Casanovas, J. M., Guillazo, G., & Artigas, F. (2001). Control of Dorsal Raphe Serotonergic Neurons by the Medial Prefrontal Cortex: Involvement of Serotonin-1A, GABA<sub>A</sub>, and Glutamate Receptors. *The Journal of Neuroscience*, 21(24), 9917–9929.
- Celada, P., Victoria Puig, M., & Artigas, F. (2013). Serotonin modulation of cortical neurons and networks. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 7(APR 2013), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fnint.2013.00025>
- Cherian, K., Schatzberg, A. F., & Keller, J. (2019). HPA axis in psychotic major depression and schizophrenia spectrum disorders: Cortisol, clinical symptomatology, and cognition. *Schizophrenia Research*, 213, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2019.07.003>
- Clarke, T.-K., Zeng, Y., Navrady, L., Xia, C., Haley, C., Campbell, A., Navarro, P., Amador, C., Adams, M. J., Howard, D. M., Soler, A., Hayward, C., Thomson, P. A., Smith, B. H., Padmanabhan, S., Hocking, L. J., Hall, L. S., Porteous, D. J., Deary, I. J., & McIntosh, A. M. (2019). Genetic and environmental determinants of stressful life events and their overlap with depression and neuroticism. *Wellcome Open Research*, 3, 11. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.13893.2>
- Colodro-Conde, L., Couvy-Duchesne, B., Zhu, G., Coventry, W. L., Byrne, E. M., Gordon, S., Wright, M. J., Montgomery, G. W., Madden, P. A. F., Major Depressive Disorder Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, Ripke, S., Eaves, L. J., Heath, A. C., Wray, N. R., Medland, S. E., & Martin, N. G. (2018). A direct test of the diathesis-stress model for depression. *Molecular Psychiatry*, 23(7), 1590–1596. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.130>
- Commons, K. G. (2020). Dorsal raphe organization. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 110, 101868. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2020.101868>

- Commons, K. G., Connelley, K. R., & Valentino, R. J. (2003). A Neurochemically Distinct Dorsal Raphe-Limbic Circuit with a Potential Role in Affective Disorders. *Neuropsychopharmacology*, *28*(2), 206–215. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300045>
- Cortés, R., Soriano, E., Pazos, A., Probst, A., & Palacios, J. M. (1988). Autoradiography of antidepressant binding sites in the human brain: localization using [<sup>3</sup>H]imipramine and [<sup>3</sup>H]paroxetine. *Neuroscience*, *27*(2), 473–496. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(88\)90282-5](https://doi.org/10.1016/0306-4522(88)90282-5)
- Crawford, L. K., Craige, C. P., & Beck, S. G. (2010). Increased Intrinsic Excitability of Lateral Wing Serotonin Neurons of the Dorsal Raphe: A Mechanism for Selective Activation in Stress Circuits. *Journal of Neurophysiology*, *103*(5), 2652–2663. <https://doi.org/10.1152/jn.01132.2009>
- Cui, X., Ren, W., Zheng, Z., & Li, J. (2020). Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation Improved Source Memory and Modulated Recollection-Based Retrieval in Healthy Older Adults. *Frontiers in Psychology*, *11*, 1137. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2020.01137>
- Culpepper, L. (2012). The Use of Monoamine Oxidase Inhibitors in Primary Care. *The Journal of Clinical Psychiatry*, *73*(suppl 1), 37–41. <https://doi.org/10.4088/JCP.11096su1c.06>
- Danish University Antidepressant Group. (1986). Citalopram: Clinical effect profile in comparison with clomipramine. A controlled multicenter study. *Psychopharmacology*, *90*(1). <https://doi.org/10.1007/BF00172884>
- Danish University Antidepressant Group. (1990). Paroxetine: A selective serotonin reuptake inhibitor showing better tolerance, but weaker antidepressant effect than clomipramine in a controlled multicenter study. *Journal of Affective Disorders*, *18*(4), 289–299. [https://doi.org/10.1016/0165-0327\(90\)90081-I](https://doi.org/10.1016/0165-0327(90)90081-I)
- de Quidt, M. E., & Emson, P. C. (1986). Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the rat central nervous system—II. Immunohistochemical analysis. *Neuroscience*, *18*(3), 545–618. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(86\)90057-6](https://doi.org/10.1016/0306-4522(86)90057-6)
- Dean, J., & Keshavan, M. (2017). The neurobiology of depression: An integrated view. *Asian Journal of Psychiatry*, *27*, 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.ajp.2017.01.025>
- DeFelipe, J., Arellano, J. I., Gómez, A., Azmitia, E. C., & Muñoz, A. (2001). Pyramidal cell axons show a local specialization for GABA and 5-HT inputs in monkey and human cerebral cortex. *Journal of Comparative Neurology*, *433*(1), 148–155. <https://doi.org/10.1002/cne.1132>
- DeFelipe, J., & Fariñas, I. (1992). The pyramidal neuron of the cerebral cortex: Morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Progress in Neurobiology*, *39*(6), 563–607. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(92\)90015-7](https://doi.org/10.1016/0301-0082(92)90015-7)
- DeFelipe, J., López-Cruz, P. L., Benavides-Piccione, R., Bielza, C., Larrañaga, P., Anderson, S., Burkhalter, A., Cauli, B., Fairén, A., Feldmeyer, D., Fishell, G., Fitzpatrick, D., Freund, T. F., González-Burgos, G., Hestrin, S., Hill, S., Hof, P. R., Huang, J., Jones, E. G., ... Ascoli, G. A. (2013). New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. *Nature Reviews Neuroscience*, *14*(3), 202–216. <https://doi.org/10.1038/nrn3444>
- Depoortère, R., Auclair, A. L., & Newman-Tancredi, A. (2021). NLX-101, a highly selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor biased agonist, mediates antidepressant-like activity in rats via prefrontal cortex 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Behavioural Brain Research*, *401*(September 2020), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.113082>
- Diaz, S. L., Doly, S., Narboux-Nême, N., Fernández, S., Mazot, P., Banas, S. M., Boutourlinsky, K., Moutkine, I., Belmer, A., Roumier, A., & Maroteaux, L. (2012). 5-HT<sub>2B</sub> receptors are required for serotonin-selective antidepressant actions. *Molecular Psychiatry*, *17*(2), 154–163. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.159>
- Drevets, W. C., Price, J. L., Simpson, J. R., Todd, R. D., Reich, T., Vannier, M., & Raichle, M. E. (1997). Subgenual prefrontal cortex abnormalities in mood disorders. *Nature*, *386*(6627), 824–827. <https://doi.org/10.1038/386824a0>
- Drevets, W. C., Savitz, J., & Trimble, M. (2008). The Subgenual Anterior Cingulate Cortex in Mood Disorders. *CNS Spectrums*, *13*(8), 663–681. <https://doi.org/10.1017/S1092852900013754>

- Duman, R., Nakagawa, S., & Malberg, J. (2001). Regulation of Adult Neurogenesis by Antidepressant Treatment. *Neuropsychopharmacology*, 25(6), 836–844. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(01\)00358-X](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(01)00358-X)
- Duman, R. S., Malberg, J., & Thome, J. (1999). Neural plasticity to stress and antidepressant treatment. *Biological Psychiatry*, 46(9), 1181–1191. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(99\)00177-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(99)00177-8)
- Dunlop, B. W., & Wong, A. (2019). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in PTSD: Pathophysiology and treatment interventions. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 89, 361–379. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.10.010>
- Elston, G. N., Benavides-Piccione, R., Elston, A., Manger, P. R., & DeFelipe, J. (2011). Pyramidal cells in prefrontal cortex of primates: marked differences in neuronal structure among species. *Frontiers in Neuroanatomy*. <https://doi.org/10.3389/fnana.2011.00002>
- Engin, E., Benham, R. S., & Rudolph, U. (2018). An Emerging Circuit Pharmacology of GABAA Receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 39(8), 710–732. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.04.003>
- Fakra, E., Hyde, L. W., Gorka, A., Fisher, P. M., Muñoz, K. E., Kimak, M., Halder, I., Ferrell, R. E., Manuck, S. B., & Hariri, A. R. (2009). Effects of HTR1A C(–1019)G on Amygdala Reactivity and Trait Anxiety. *Archives of General Psychiatry*, 66(1), 33. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.66.1.33>
- Feng, J., Cai, X., Zhao, J., & Yan, Z. (2001). Serotonin receptors modulate GABA(A) receptor channels through activation of anchored protein kinase C in prefrontal cortical neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(17), 6502–6511.
- Férezou, I., Cauli, B., Hill, E. L., Rossier, J., Hamel, E., & Lambolez, B. (2002). 5-HT<sub>3</sub> receptors mediate serotonergic fast synaptic excitation of neocortical vasoactive intestinal peptide/cholecystokinin interneurons. *Journal of Neuroscience*, 22(17), 7389–7397. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-17-07389.2002>
- Ferré, S., & Artigas, F. (2006). Dopamine D2 Receptor-Mediated Regulation of Serotonin Extracellular Concentration in the Dorsal Raphe Nucleus of Freely Moving Rats. *Journal of Neurochemistry*, 61(2), 772–775. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb02187.x>
- Frankiensztajn, L. M., Elliott, E., & Koren, O. (2020). The microbiota and the hypothalamus-pituitary-adrenocortical (HPA) axis, implications for anxiety and stress disorders. *Current Opinion in Neurobiology*, 62, 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.12.003>
- Frith, C. D., & Frith, U. (2006). The Neural Basis of Mentalizing. *Neuron*, 50(4), 531–534. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.05.001>
- Frodl, T., Meisenzahl, E. M., Zetzsche, T., Born, C., Jäger, M., Groll, C., Bottlender, R., Leinsinger, G., & Möller, H.-J. (2003). Larger amygdala volumes in first depressive episode as compared to recurrent major depression and healthy control subjects. *Biological Psychiatry*, 53(4), 338–344. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(02\)01474-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(02)01474-9)
- Fu, W., le Maître, E., Fabre, V., Bernard, J.-F., David Xu, Z.-Q., & Hökfelt, T. (2010). Chemical neuroanatomy of the dorsal raphe nucleus and adjacent structures of the mouse brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 518(17), 3464–3494. <https://doi.org/10.1002/cne.22407>
- Fuchikami, M., Thomas, A., Liu, R., Wohleb, E. S., Land, B. B., DiLeone, R. J., Aghajanian, G. K., & Duman, R. S. (2015). Optogenetic stimulation of infralimbic PFC reproduces ketamine's rapid and sustained antidepressant actions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(26), 8106–8111. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414728112>
- Fuchs, T., Jefferson, S. J., Hooper, A., Yee, P.-H., Maguire, J., & Luscher, B. (2017). Disinhibition of somatostatin-positive GABAergic interneurons results in an anxiolytic and antidepressant-like brain state. *Molecular Psychiatry*, 22(6), 920–930. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.188>
- Fullana, M. N., Covelo, A., Bortolozzi, A., Araque, A., & Artigas, F. (2019a). In vivo Knockdown of astroglial glutamate transporters GLT-1 and GLAST increases excitatory neurotransmission in mouse infralimbic cortex: Relevance for

depressive-like phenotypes. *Eur Neuropsychopharmacol*, 29(11), 1288–1294.  
<https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2019.09.004>. In

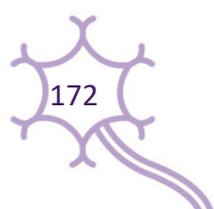
- Fullana, M. N., Ruiz-Bronchal, E., Ferrés-Coy, A., Juárez-Escoto, E., Artigas, F., & Bortolozzi, A. (2019b). Regionally selective knockdown of astroglial glutamate transporters in infralimbic cortex induces a depressive phenotype in mice. *Glia*, 67(6), 1122–1137. <https://doi.org/10.1002/glia.23593>
- Fullana, N., Gasull-Camós, J., Tarrés-Gatius, M., Castañé, A., Bortolozzi, A., & Artigas, F. (2020). Astrocyte control of glutamatergic activity: Downstream effects on serotonergic function and emotional behavior. *Neuropharmacology*, 166(September 2019). <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107914>
- Fumagalli, M., & Priori, A. (2012). Functional and clinical neuroanatomy of morality. *Brain*, 135(7), 2006–2021. <https://doi.org/10.1093/brain/awr334>
- Fuster, J. (2008). *The Prefrontal Cortex* (4th ed.). Elsevier.
- Fuster, J. M. (2001). The Prefrontal Cortex—An Update: time is of the essence. *Neuron*, 30(2), 319–333. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00285-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00285-9)
- Fuxe, K., Calza, L., Benfenati, F., Zini, I., & Agnati, L. F. (1983). Quantitative autoradiographic localization of [3H]imipramine binding sites in the brain of the rat: relationship to ascending 5-hydroxytryptamine neuron systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(12), 3836–3840. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.12.3836>
- Gabbott, P. L. A., Warner, T. A., Jays, P. R. L., Salway, P., & Busby, S. J. (2005). Prefrontal cortex in the rat: Projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *Journal of Comparative Neurology*, 492(2), 145–177. <https://doi.org/10.1002/cne.20738>
- Gallo, D. A., McDonough, I. M., & Scimeca, J. (2010). Dissociating source memory decisions in the prefrontal cortex: fMRI of diagnostic and disqualifying monitoring. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 22(5), 955–969. <https://doi.org/10.1162/jocn.2009.21263>
- Gallucci, A., Riva, P., Romero Lauro, L. J., & Bushman, B. J. (2020). Stimulating the ventrolateral prefrontal cortex (VLPFC) modulates frustration-induced aggression: A tDCS experiment. *Brain Stimulation*, 13(2), 302–309. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2019.10.015>
- Galynker, I. I., Cai, J., Ongseng, F., Finestone, H., Dutta, E., & Sersen, D. (1998). Hypofrontality and negative symptoms in major depressive disorder. *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 39(4), 608–612.
- Gao, J., Zheng, P., Jia, Y., Chen, H., Mao, Y., Chen, S., Wang, Y., Fu, H., & Dai, J. (2020). Mental health problems and social media exposure during COVID-19 outbreak. *PLOS ONE*, 15(4), e0231924. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231924>
- Garro-Martínez, E., Fullana, M. N., Florensa-Zanuy, E., Senserrich, J., Paz, V., Ruiz-Bronchal, E., Adell, A., Castro, E., Díaz, Á., Pazos, Á., Bortolozzi, A., & Pilar-Cuéllar, F. (2021). mTOR Knockdown in the Infralimbic Cortex Evokes A Depressive-like State in Mouse. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8671. <https://doi.org/10.3390/ijms22168671>
- Gartlehner, G., Hansen, R. A., Morgan, L. C., Thaler, K., Lux, L., van Noord, M., Mager, U., Thieda, P., Gaynes, B. N., Wilkins, T., Strobelberger, M., Lloyd, S., Reichenpfader, U., & Lohr, K. N. (2011). Comparative Benefits and Harms of Second-Generation Antidepressants for Treating Major Depressive Disorder. *Annals of Internal Medicine*, 155(11), 772. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-155-11-201112060-00009>
- Gartside, S. E., Cole, A. J., Williams, A. P., McQuade, R., & Judge, S. J. (2007). AMPA and NMDA receptor regulation of firing activity in 5-HT neurons of the dorsal and median raphe nuclei. *The European Journal of Neuroscience*, 25(10), 3001–3008. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05577.x>

- Gasull-Camós, J., Martínez-Torres, S., Tarrés-Gatius, M., Ozaita, A., Artigas, F., & Castañé, A. (2018). Serotonergic mechanisms involved in antidepressant-like responses evoked by GLT-1 blockade in rat infralimbic cortex. *Neuropharmacology*, *139*, 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.06.029>
- Gasull-Camós, J., Soto-Montenegro, M. L., Casquero-Veiga, M., Desco, M., Artigas, F., & Castañé, A. (2017). Differential patterns of subcortical activity evoked by glial GLT-1 blockade in prelimbic and infralimbic cortex: Relationship to antidepressant-like effects in rats. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *20*(12), 988–993. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyx067>
- Glazer, E. J., Steinbusch, H., Verhofstad, A., & Basbaum, A. I. (1981). Serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis and paragigantocellularis of the cat contain enkephalin. *Journal de Physiologie*, *77*(2–3), 241–245.
- Goldstein, D. J., Mallinckrodt, C., Lu, Y., & Demitrack, M. A. (2002). Duloxetine in the Treatment of Major Depressive Disorder. *The Journal of Clinical Psychiatry*, *63*(3), 225–231. <https://doi.org/10.4088/JCP.v63n0309>
- Gonçalves, L., Nogueira, M. I., Shammah-Lagnado, S. J., & Metzger, M. (2009). Prefrontal afferents to the dorsal raphe nucleus in the rat. *Brain Research Bulletin*, *78*(4–5), 240–247. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2008.11.012>
- González-Sanguino, C., Ausín, B., Castellanos, M. Á., Saiz, J., López-Gómez, A., Ugidos, C., & Muñoz, M. (2020). Mental health consequences during the initial stage of the 2020 Coronavirus pandemic (COVID-19) in Spain. *Brain, Behavior, and Immunity*, *87*, 172–176. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.05.040>
- Goodfellow, N. M., Bailey, C. D. C., & Lambe, E. K. (2012). The native serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor: electrophysiological characterization in rodent cortex and 5-HT<sub>1A</sub>-mediated compensatory plasticity in the knock-out mouse. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *32*(17), 5804–5809. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4849-11.2012>
- Groenewegen, H. J., & Uylings, H. B. M. (2000). The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information. *Progress in Brain Research*, *126*(1), 3–28. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(00\)26003-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(00)26003-2)
- Grzelka, K., Kurowski, P., Gawlak, M., & Szulczyk, P. (2017). Noradrenaline Modulates the Membrane Potential and Holding Current of Medial Prefrontal Cortex Pyramidal Neurons via  $\beta$ <sub>1</sub>-Adrenergic Receptors and HCN Channels. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *11*, 341. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00341>
- Gunduz-Bruce, H., Silber, C., Kaul, I., Rothschild, A. J., Riesenberger, R., Sankoh, A. J., Li, H., Lasser, R., Zorumski, C. F., Rubinow, D. R., Paul, S. M., Jonas, J., Doherty, J. J., & Kanes, S. J. (2019). Trial of SAGE-217 in Patients with Major Depressive Disorder. *New England Journal of Medicine*, *381*(10), 903–911. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1815981>
- Gunduz-Bruce, H., Takahashi, K., & Huang, M. (2022). Development of neuroactive steroids for the treatment of postpartum depression. *Journal of Neuroendocrinology*, *34*(2). <https://doi.org/10.1111/jne.13019>
- Guo, L. T., Wang, S. Q., Su, J., Xu, L. X., Ji, Z. Y., Zhang, R. Y., Zhao, Q. W., Ma, Z. Q., Deng, X. Y., & Ma, S. P. (2019). Baicalin ameliorates neuroinflammation-induced depressive-like behavior through inhibition of toll-like receptor 4 expression via the PI3K/AKT/FoxO1 pathway. *Journal of Neuroinflammation*, *16*(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1474-8>
- Gusnard, D. A., Akbudak, E., Shulman, G. L., & Raichle, M. E. (2001). Medial prefrontal cortex and self-referential mental activity: Relation to a default mode of brain function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(7), 4259–4264. <https://doi.org/10.1073/pnas.071043098>
- Gustavsson, A., Svensson, M., Jacobi, F., Allgulander, C., Alonso, J., Beghi, E., Dodel, R., Ekman, M., Faravelli, C., Fratiglioni, L., Gannon, B., Jones, D. H., Jenum, P., Jordanova, A., Jönsson, L., Karampampa, K., Knapp, M., Kobelt, G., Kurth, T., ... Olesen, J. (2011). Cost of disorders of the brain in Europe 2010. *European Neuropsychopharmacology*, *21*(10), 718–779. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2011.08.008>
- Haenisch, B., Herms, S., Mattheisen, M., Steffens, M., Breuer, R., Strohmaier, J., Degenhardt, F., Schmä, C., Lucae, S., Maier, W., Rietschel, M., Nöthen, M. M., & Cichon, S. (2013). Genome-wide association data provide further

support for an association between 5-HTTLPR and major depressive disorder. *Journal of Affective Disorders*, 146(3), 438–440. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2012.08.001>

- Haj-Dahmane, S., Bélique, J. C., & Shen, R.-Y. (2017). GluA2-Lacking AMPA Receptors and Nitric Oxide Signaling Gate Spike-Timing-Dependent Potentiation of Glutamate Synapses in the Dorsal Raphe Nucleus. *ENeuro*, 4(3). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0116-17.2017>
- Hajós, M., Richards, C. D., Székely, A. D., & Sharp, T. (1998). An electrophysiological and neuroanatomical study of the medial prefrontal cortical projection to the midbrain raphe nuclei in the rat. *Neuroscience*, 87(1), 95–108. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(98\)00157-2](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00157-2)
- Harandi, M., Aguera, M., Gamrani, H., Didier, M., Maitre, M., Calas, A., & Belin, M. F. (1987).  $\gamma$ -Aminobutyric acid and 5-hydroxytryptamine interrelationship in the rat nucleus raphe dorsalis: Combination of radioautographic and immunocytochemical techniques at light and electron microscopy levels. *Neuroscience*, 21(1), 237–251. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(87\)90336-8](https://doi.org/10.1016/0306-4522(87)90336-8)
- Haro, J. M., Palacín, C., Vilagut, G., Martínez, M., Bernal, M., Luque, I., Codony, M., Dolz, M., & Alonso, J. (2006). Prevalencia de los trastornos mentales y factores asociados: resultados del estudio ESEMeD-España. *Medicina Clínica*, 126(12), 445–451. <https://doi.org/10.1157/13086324>
- Hashimoto, K., Shimizu, E., & Iyo, M. (2004). Critical role of brain-derived neurotrophic factor in mood disorders. *Brain Research Reviews*, 45(2), 104–114. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.02.003>
- Heberlein, A. S., Padon, A. A., Gillihan, S. J., Farah, M. J., & Fellows, L. K. (2008). Ventromedial Frontal Lobe Plays a Critical Role in Facial Emotion Recognition. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 20(4), 721–733. <https://doi.org/10.1162/jocn.2008.20049>
- Helboe, L., Egebjerg, J., & de Jong, I. E. M. (2015). Distribution of serotonin receptor 5-HT<sub>6</sub> mRNA in rat neuronal subpopulations: A double in situ hybridization study. *Neuroscience*, 310, 442–454. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.09.064>
- Henny, P., & Jones, B. E. (2008). Projections from basal forebrain to prefrontal cortex comprise cholinergic, GABAergic and glutamatergic inputs to pyramidal cells or interneurons. *European Journal of Neuroscience*, 27(3), 654–670. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06029.x>
- Hernández-Vázquez, F., Garduño, J., & Hernández-López, S. (2019). GABAergic modulation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Reviews in the Neurosciences*, 30(3), 289–303. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2018-0014>
- Hertrich, I., Dietrich, S., Blum, C., & Ackermann, H. (2021). The Role of the Dorsolateral Prefrontal Cortex for Speech and Language Processing. *Frontiers in Human Neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2021.645209>
- Hervás, I., & Artigas, F. (1998). Effect of fluoxetine on extracellular 5-hydroxytryptamine in rat brain. Role of 5-HT autoreceptors. *European Journal of Pharmacology*, 358(1), 9–18. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(98\)00579-2](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(98)00579-2)
- Hervás, I., Vilaró, M. T., Romero, L., Scorza, M. C., Mengog, G., & Artigas, F. (2001). Desensitization of 5-HT<sub>1A</sub> Autoreceptors by a Low Chronic Fluoxetine Dose Effect of the Concurrent Administration of WAY-100635. *Neuropsychopharmacology*, 24(1), 11–20. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(00\)00175-5](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(00)00175-5)
- Hirschfeld, R. M. A. (2000). History and Evolution of the Monoamine Hypothesis of Depression. *J Clin Psychiatry*, 61.
- Hiser, J., & Koenigs, M. (2018). The Multifaceted Role of the Ventromedial Prefrontal Cortex in Emotion, Decision Making, Social Cognition, and Psychopathology. *Biological Psychiatry*, 83(8), 638–647. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.10.030>
- Höfelfelt, T., Ljungdahl, Å., Steinbusch, H., Verhofstad, A., Nilsson, G., Brodin, E., Pernow, B., & Goldstein, M. (1978). Immunohistochemical evidence of substance P-like immunoreactivity in some 5-hydroxytryptamine-containing neurons in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 3(6), 517–538. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(78\)90017-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(78)90017-9)

- Hoover, W. B., & Vertes, R. P. (2007). Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Structure & Function*, 212(2), 149–179. <https://doi.org/10.1007/s00429-007-0150-4>
- Hornung, J.-P. (2010). *The Neuroanatomy of the Serotonergic System* (pp. 51–64). [https://doi.org/10.1016/S1569-7339\(10\)70071-0](https://doi.org/10.1016/S1569-7339(10)70071-0)
- Huang, K. W., Ochandarena, N. E., Philson, A. C., Hyun, M., Birnbaum, J. E., Cicconet, M., & Sabatini, B. L. (2019). Molecular and anatomical organization of the dorsal raphe nucleus. *ELife*, 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.46464>
- Hughes, B. A., Bohnsack, J. P., O'Buckley, T. K., Herman, M. A., & Morrow, A. L. (2019). Chronic Ethanol Exposure and Withdrawal Impair Synaptic  $\text{GABA}_A$  Receptor-Mediated Neurotransmission in Deep-Layer Prefrontal Cortex. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 43(5), 822–832. <https://doi.org/10.1111/acer.14015>
- Huttenlocher, P. R., & Dabholkar, A. S. (1997). Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex. *The Journal of Comparative Neurology*, 387(2), 167–178. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9861\(19971020\)387:2<167::aid-cne1>3.0.co;2-z](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9861(19971020)387:2<167::aid-cne1>3.0.co;2-z)
- Ishibashi, M., Gumenchuk, I., Miyazaki, K., Inoue, T., Ross, W. N., & Leonard, C. S. (2016). Hypocretin/Orexin Peptides Alter Spike Encoding by Serotonergic Dorsal Raphe Neurons through Two Distinct Mechanisms That Increase the Late Afterhyperpolarization. *Journal of Neuroscience*, 36(39), 10097–10115. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0635-16.2016>
- Jacobs, B. L., & Azmitia, E. C. (1992). Structure and function of the brain serotonin system. *Physiological Reviews*, 72(1), 165–229. <https://doi.org/10.1152/physrev.1992.72.1.165>
- Jacobs, B. L., van Praag, H., & Gage, F. H. (2000). Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. *Molecular Psychiatry*, 5(3), 262–269. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000712>
- Ji, G., & Neugebauer, V. (2012). Modulation of medial prefrontal cortical activity using in vivo recordings and optogenetics. *Molecular Brain*, 5(1), 36. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-5-36>
- Jick, H., Haye, J. A., & Jick, S. S. (2004). Antidepressants and the Risk of Suicidal Behaviors. *JAMA*, 292(3), 338. <https://doi.org/10.1001/jama.292.3.338>
- Jiménez-Sánchez, L., Castañé, A., Pérez-Caballero, L., Grifoll-Escoda, M., López-Gil, X., Campa, L., Galofré, M., Berrocoso, E., & Adell, A. (2016). Activation of AMPA Receptors Mediates the Antidepressant Action of Deep Brain Stimulation of the Infralimbic Prefrontal Cortex. *Cerebral Cortex*, 26(6), 2778–2789. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhv133>
- Jinno, S., & Kosaka, T. (2004). Parvalbumin is expressed in glutamatergic and GABAergic corticostriatal pathway in mice. *The Journal of Comparative Neurology*, 477(2), 188–201. <https://doi.org/10.1002/cne.20246>
- Johnson, M. D. (1994). Electrophysiological and histochemical properties of postnatal rat serotonergic neurons in dissociated cell culture. *Neuroscience*, 63(3), 775–787. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90522-3](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90522-3)
- Jones, E. G. (2001). The thalamic matrix and thalamocortical synchrony. *Trends in Neurosciences*, 24(10), 595–601. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)01922-6](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)01922-6)
- Kanes, S., Colquhoun, H., Gunduz-Bruce, H., Raines, S., Arnold, R., Schacterle, A., Doherty, J., Epperson, C. N., Deligiannidis, K. M., Riesenberg, R., Hoffmann, E., Rubinow, D., Jonas, J., Paul, S., & Meltzer-Brody, S. (2017). Brexanolone (SAGE-547 injection) in post-partum depression: a randomised controlled trial. *The Lancet*, 390(10093), 480–489. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31264-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31264-3)
- Karege, F., Vaudan, G., Schwald, M., Perroud, N., & la Harpe, R. (2005). Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. *Molecular Brain Research*, 136(1–2), 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2004.12.020>
- Karg, K., Burmeister, M., Shedden, K., & Sen, S. (2011). The Serotonin Transporter Promoter Variant (5-HTTLPR), Stress, and Depression Meta-analysis Revisited. *Archives of General Psychiatry*, 68(5), 444. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2010.189>



- Kashfi, S. S., Abdollahi, G., Hassanzadeh, J., Mokarami, H., & Khani Jeihooni, A. (2022). The relationship between osteoporosis and depression. *Scientific Reports*, *12*(1), 11177. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15248-w>
- Kaumann, A. J., & Levy, F. O. (2006). 5-hydroxytryptamine receptors in the human cardiovascular system. *Pharmacology & Therapeutics*, *111*(3), 674–706. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.12.004>
- Kendler, K. S., Thornton, L. M., & Gardner, C. O. (2001). Genetic Risk, Number of Previous Depressive Episodes, and Stressful Life Events in Predicting Onset of Major Depression. *American Journal of Psychiatry*, *158*(4), 582–586. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.158.4.582>
- Kiecolt-Glaser, J. K., Derry, H. M., & Fagundes, C. P. (2015). Inflammation: Depression fans the flames and feasts on the heat. In *American Journal of Psychiatry* (Vol. 172, Issue 11, pp. 1075–1091). American Psychiatric Association. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2015.15020152>
- Kimbrell, T. A., Ketter, T. A., George, M. S., Little, J. T., Benson, B. E., Willis, M. W., Herscovitch, P., & Post, R. M. (2002). Regional cerebral glucose utilization in patients with a range of severities of unipolar depression. *Biological Psychiatry*, *51*(3), 237–252. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(01\)01216-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(01)01216-1)
- Koenigs, M., Huey, E. D., Calamia, M., Raymont, V., Tranel, D., & Grafman, J. (2008). Distinct Regions of Prefrontal Cortex Mediate Resistance and Vulnerability to Depression. *Journal of Neuroscience*, *28*(47), 12341–12348. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2324-08.2008>
- Koenigs, M., Huey, E. D., Raymont, V., Cheon, B., Solomon, J., Wassermann, E. M., & Grafman, J. (2008). Focal brain damage protects against post-traumatic stress disorder in combat veterans. *Nature Neuroscience*, *11*(2), 232–237. <https://doi.org/10.1038/nn2032>
- Kovacs, M., Obrosky, S., & George, C. (2016). The course of major depressive disorder from childhood to young adulthood: Recovery and recurrence in a longitudinal observational study. *Journal of Affective Disorders*, *203*, 374–381. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2016.05.042>
- Krystal, J. H., Abdallah, C. G., Sanacora, G., Charney, D. S., & Duman, R. S. (2019). Ketamine: A Paradigm Shift for Depression Research and Treatment. *Neuron*, *101*(5), 774–778. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.02.005>
- Krystal, J. H., D'Souza, D. C., Mathalon, D., Perry, E., Belger, A., & Hoffman, R. (2003). NMDA receptor antagonist effects, cortical glutamatergic function, and schizophrenia: toward a paradigm shift in medication development. *Psychopharmacology*, *169*(3–4), 215–233. <https://doi.org/10.1007/s00213-003-1582-z>
- Kuroda, M., Yokofujita, J., & Murakami, K. (1998). An ultrastructural study of the neural circuit between the prefrontal cortex and the mediodorsal nucleus of the thalamus. *Progress in Neurobiology*, *54*(4), 417–458. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(97\)00070-1](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(97)00070-1)
- Lai, T.-J., Payne, M. E., Byrum, C. E., Steffens, D. C., & Krishnan, K. R. R. (2000). Reduction of orbital frontal cortex volume in geriatric depression. *Biological Psychiatry*, *48*(10), 971–975. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(00\)01042-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(00)01042-8)
- Launay, J., Schneider, B., Loric, S., Prada, M. da, & Kellermann, O. (2006). Serotonin transport and serotonin transporter-mediated antidepressant recognition are controlled by 5-HT<sub>2B</sub> receptor signaling in serotonergic neuronal cells. *The FASEB Journal*, *20*(11), 1843–1854. <https://doi.org/10.1096/fj.06-5724com>
- Lee, B.-H., & Kim, Y.-K. (2009). Reduced platelet BDNF level in patients with major depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *33*(5), 849–853. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2009.04.002>
- Lee, Vogt, D., Rubenstein, J. L., & Sohal, V. S. (2014). A Class of GABAergic Neurons in the Prefrontal Cortex Sends Long-Range Projections to the Nucleus Accumbens and Elicits Acute Avoidance Behavior. *Journal of Neuroscience*, *34*(35), 11519–11525. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1157-14.2014>
- Lemondé, S., Turecki, G., Bakish, D., Du, L., Hrdina, P. D., Bown, C. D., Sequeira, A., Kushwaha, N., Morris, S. J., Basak, A., Ou, X.-M., & Albert, P. R. (2003). Impaired Repression at a 5-Hydroxytryptamine 1A Receptor Gene Polymorphism Associated with Major Depression and Suicide. *The Journal of Neuroscience*, *23*(25), 8788–8799. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-25-08788.2003>

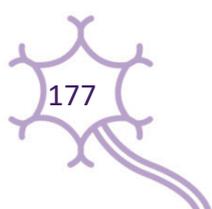
- Levine, E. S., & Jacobs, B. L. (1992). Microiontophoresis and single-unit recordings of serotonergic neurons in the awake cat. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 5(4), 335–337. [https://doi.org/10.1016/0891-0618\(92\)90022-1](https://doi.org/10.1016/0891-0618(92)90022-1)
- Lewis, D. A., & González-Burgos, G. (2008). Neuroplasticity of Neocortical Circuits in Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 33(1), 141–165. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301563>
- Li, N., Lee, B., Liu, R.-J., Banasr, M., Dwyer, J. M., Iwata, M., Li, X.-Y., Aghajanian, G., & Duman, R. S. (2010). mTOR-Dependent Synapse Formation Underlies the Rapid Antidepressant Effects of NMDA Antagonists. *Science*, 329(5994), 959–964. <https://doi.org/10.1126/science.1190287>
- Li, Y.-Q., Li, H., Kaneko, T., & Mizuno, N. (2001). Morphological features and electrophysiological properties of serotonergic and non-serotonergic projection neurons in the dorsal raphe nucleus. *Brain Research*, 900(1), 110–118. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02272-7](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02272-7)
- Lim, L., Mi, D., Llorca, A., & Marín, O. (2018). Development and Functional Diversification of Cortical Interneurons. *Neuron*, 100(2), 294–313. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.10.009>
- Lim, L. W., Prickaerts, J., Huguet, G., Kadar, E., Hartung, H., Sharp, T., & Temel, Y. (2015). Electrical stimulation alleviates depressive-like behaviors of rats: investigation of brain targets and potential mechanisms. *Translational Psychiatry*, 5(3), e535–e535. <https://doi.org/10.1038/tp.2015.24>
- Linley, S. B., Hoover, W. B., & Vertes, R. P. (2013). Pattern of distribution of serotonergic fibers to the orbitomedial and insular cortex in the rat. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 48–49, 29–45. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2012.12.006>
- López-Terrones, E., Celada, P., Riga, M. S., & Artigas, F. (2022). Preferential in vivo inhibitory action of serotonin in rat infralimbic versus prelimbic cortex: relevance for antidepressant treatments. *Cerebral Cortex*, 32(14), 3000–3013. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhab396>
- Lucas, G., Compan, V., Charnay, Y., Neve, R. L., Nestler, E. J., Bockaert, J., Barrot, M., & Debonnel, G. (2005). Frontocortical 5-HT<sub>4</sub> receptors exert positive feedback on serotonergic activity: Viral transfections, subacute and chronic treatments with 5-HT<sub>4</sub> agonists. *Biological Psychiatry*, 57(8), 918–925. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.12.023>
- Lucas, G., Rymar, V. v., Du, J., Mnie-Filali, O., Bisgaard, C., Manta, S., Lambas-Senas, L., Wiborg, O., Haddjeri, N., Piñeyro, G., Sadikot, A. F., & Debonnel, G. (2007). Serotonin<sub>4</sub> (5-HT<sub>4</sub>) Receptor Agonists Are Putative Antidepressants with a Rapid Onset of Action. *Neuron*, 55(5), 712–725. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.07.041>
- Machado-Vieira, R., Baumann, J., Wheeler-Castillo, C., Latov, D., Henter, I. D., Salvatore, G., & Zarate, C. A. (2010). The Timing of Antidepressant Effects: A Comparison of Diverse Pharmacological and Somatic Treatments. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 3(1), 19–41. <https://doi.org/10.3390/ph3010019>
- MacQueen, G. M., Campbell, S., McEwen, B. S., Macdonald, K., Amano, S., Joffe, R. T., Nahmias, C., & Young, L. T. (2003). Course of illness, hippocampal function, and hippocampal volume in major depression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(3), 1387–1392. <https://doi.org/10.1073/pnas.0337481100>
- Malberg, J. E., & Duman, R. S. (2003). Cell Proliferation in Adult Hippocampus is Decreased by Inescapable Stress: Reversal by Fluoxetine Treatment. *Neuropsychopharmacology*, 28(9), 1562–1571. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300234>
- Malhi, G. S., Outhred, T., Hamilton, A., Boyce, P. M., Bryant, R., Fitzgerald, P. B., Lyndon, B., Mulder, R., Murray, G., Porter, R. J., Singh, A. B., & Fritz, K. (2018). Royal Australian and New Zealand College of Psychiatrists clinical practice guidelines for mood disorders: major depression summary. *Medical Journal of Australia*, 208(4), 175–180. <https://doi.org/10.5694/mja17.00659>
- Marek, R., Xu, L., Sullivan, R. K. P., & Sah, P. (2018). Excitatory connections between the prelimbic and infralimbic medial prefrontal cortex show a role for the prelimbic cortex in fear extinction. *Nature Neuroscience*, 21(5), 654–658. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0137-x>

- Marín-Padilla, M. (1990). Three-dimensional structural organization of layer I of the human cerebral cortex: A golgi study. *Journal of Comparative Neurology*, 299(1), 89–105. <https://doi.org/10.1002/cne.902990107>
- Masi, G., & Brovedani, P. (2011). The Hippocampus, Neurotrophic Factors and Depression. *CNS Drugs*, 25(11), 913–931. <https://doi.org/10.2165/11595900-000000000-00000>
- Mayberg, H. S., Brannan, S. K., Tekell, J. L., Silva, J. A., Mahurin, R. K., McGinnis, S., & Jerabek, P. A. (2000). Regional metabolic effects of fluoxetine in major depression: serial changes and relationship to clinical response. *Biological Psychiatry*, 48(8), 830–843. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(00\)01036-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(00)01036-2)
- Mayberg, H. S., Lozano, A. M., Voon, V., McNeely, H. E., Seminowicz, D., Hamani, C., Schwab, J. M., & Kennedy, S. H. (2005). Deep Brain Stimulation for Treatment-Resistant Depression. *Neuron*, 45(5), 651–660. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.02.014>
- McKinnon, M. C., Yucel, K., Nazarov, A., & MacQueen, G. M. (2009). A meta-analysis examining clinical predictors of hippocampal volume in patients with major depressive disorder. *Journal of Psychiatry & Neuroscience : JPN*, 34(1), 41–54.
- McLaughlin, K. A., Conron, K. J., Koenen, K. C., & Gilman, S. E. (2010). Childhood adversity, adult stressful life events, and risk of past-year psychiatric disorder: A test of the stress sensitization hypothesis in a population-based sample of adults. *Psychological Medicine*, 40(10), 1647–1658. <https://doi.org/10.1017/S0033291709992121>
- McQuade, R., & Sharp, T. (1997). Functional Mapping of Dorsal and Median Raphe 5-Hydroxytryptamine Pathways in Forebrain of the Rat Using Microdialysis. *Journal of Neurochemistry*, 69(2), 791–796. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69020791.x>
- Medeiros, G. C., Roy, D., Kontos, N., & Beach, S. R. (2020). Post-stroke depression: A 2020 updated review. *General Hospital Psychiatry*, 66, 70–80. <https://doi.org/10.1016/j.genhosppsych.2020.06.011>
- Melartin, T. K., Rytsälä, H. J., Leskelä, U. S., Lestelä-Mielonen, P. S., Sokero, T. P., & Isometsä, E. T. (2004). Severity and Comorbidity Predict Episode Duration and Recurrence of DSM-IV Major Depressive Disorder. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 65(6), 810–819. <https://doi.org/10.4088/JCP.v65n0612>
- Milad, M. R., & Quirk, G. J. (2002). Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. *Nature*, 420(6911), 70–74. <https://doi.org/10.1038/nature01138>
- Moncrieff, J., Cooper, R. E., Stockmann, T., Amendola, S., Hengartner, M. P., & Horowitz, M. A. (2022). The serotonin theory of depression: a systematic umbrella review of the evidence. *Molecular Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01661-0>
- Monteleone, P., Serritella, C., Martiadis, V., & Maj, M. (2008). Decreased levels of serum brain-derived neurotrophic factor in both depressed and euthymic patients with unipolar depression and in euthymic patients with bipolar I and II disorders. *Bipolar Disorders*, 10(1), 95–100. <https://doi.org/10.1111/j.1399-5618.2008.00459.x>
- Morales, M., & Bloom, F. E. (1997). The 5-HT<sub>3</sub> receptor is present in different subpopulations of GABAergic neurons in the rat telencephalon. *Journal of Neuroscience*, 17(9), 3157–3167. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.17-09-03157.1997>
- Moreno, C., Hasin, D. S., Arango, C., Oquendo, M. A., Vieta, E., Liu, S., Grant, B. F., & Blanco, C. (2012). Depression in bipolar disorder versus major depressive disorder: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *Bipolar Disorders*, 14(3), 271–282. <https://doi.org/10.1111/j.1399-5618.2012.01009.x>
- Morris, L. S., Costi, S., Tan, A., Stern, E. R., Charney, D. S., & Murrough, J. W. (2020). Ketamine normalizes subgenual cingulate cortex hyper-activity in depression. *Neuropsychopharmacology*, 45(6), 975–981. <https://doi.org/10.1038/s41386-019-0591-5>
- Morrison, S. F., Madden, C. J., & Tupone, D. (2012). An orexinergic projection from perifornical hypothalamus to raphe pallidus increases rat brown adipose tissue thermogenesis. *Adipocyte*, 1(2), 116–120. <https://doi.org/10.4161/adip.19736>

- Mukherjee, A., & Caroni, P. (2018). Infralimbic cortex is required for learning alternatives to prelimbic promoted associations through reciprocal connectivity. *Nature Communications*, *9*(1), 2727. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05318-x>
- Muñoz-Navarro, R., Cano Vindel, A., Schmitz, F., Cabello, R., & Fernández-Berrocal, P. (2021). Emotional Disorders During the COVID-19 Outbreak in Spain: The Role of Sociodemographic Risk Factors and Cognitive Emotion Regulation Strategies. *Health Education & Behavior*, *48*(4), 412–423. <https://doi.org/10.1177/10901981211014101>
- Muzerelle, A., Scotto-Lomassese, S., Bernard, J. F., Soiza-Reilly, M., & Gaspar, P. (2016). Conditional anterograde tracing reveals distinct targeting of individual serotonin cell groups (B5–B9) to the forebrain and brainstem. *Brain Structure and Function*, *221*(1), 535–561. <https://doi.org/10.1007/s00429-014-0924-4>
- Neff, C. D., Abkevich, V., Packer, J. C. L., Chen, Y., Potter, J., Riley, R., Davenport, C., DeGrado Warren, J., Jammulapati, S., Bhatena, A., Choi, W. S., Kroeger, P. E., Metzger, R. E., Gutin, A., Skolnick, M. H., Shattuck, D., & Katz, D. A. (2009). Evidence for HTR1A and LHPP as interacting genetic risk factors in major depression. *Molecular Psychiatry*, *14*(6), 621–630. <https://doi.org/10.1038/mp.2008.8>
- Nerurkar, L. S. S. M. I. B. ; C. J. (2019). Rheumatoid arthritis and depression: an inflammatory perspective. *The Lancet*, *6*(2), 164–173.
- Nibuya, M., Nestler, E., & Duman, R. (1996). Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, *16*(7), 2365–2372. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-07-02365.1996>
- Nicholas, M. N. and G. M. (2017). Psoriasis, Depression, and Suicidality. *Skin Therapy Letter*, *22*(3).
- Nierenberg, A. A., Greist, J. H., Mallinckrodt, C. H., Prakash, A., Sambunaris, A., Tollefson, G. D., & Wohlreich, M. M. (2007). Duloxetine versus escitalopram and placebo in the treatment of patients with major depressive disorder: onset of antidepressant action, a non-inferiority study. *Current Medical Research and Opinion*, *23*(2), 401–416. <https://doi.org/10.1185/030079906X167453>
- Nord, M., Finnema, S. J., Halldin, C., & Farde, L. (2013). Effect of a single dose of escitalopram on serotonin concentration in the non-human and human primate brain. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *16*(7), 1577–1586. <https://doi.org/10.1017/S1461145712001617>
- Northoff, G., Heinzl, A., de Greck, M., Bermpohl, F., Dobrowolny, H., & Panksepp, J. (2006). Self-referential processing in our brain—A meta-analysis of imaging studies on the self. *NeuroImage*, *31*(1), 440–457. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2005.12.002>
- O'Brien, S. M., Scott, L. v., & Dinan, T. G. (2004). Cytokines: abnormalities in major depression and implications for pharmacological treatment. *Human Psychopharmacology: Clinical & Experimental*, *19*(6), 397–403.
- Okaty, B. W., Commons, K. G., & Dymecki, S. M. (2019). Embracing diversity in the 5-HT neuronal system. *Nature Reviews Neuroscience*, *20*(7), 397–424. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0151-3>
- Okaty, B. W., Freret, M. E., Rood, B. D., Brust, R. D., Hennessy, M. L., deBairos, D., Kim, J. C., Cook, M. N., & Dymecki, S. M. (2015). Multi-Scale Molecular Deconstruction of the Serotonin Neuron System. *Neuron*, *88*(4), 774–791. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.10.007>
- Okaty, B. W., Sturrock, N., Escobedo Lozoya, Y., Chang, Y., Senft, R. A., Lyon, K. A., Alekseyenko, O. v., & Dymecki, S. M. (2020). A single-cell transcriptomic and anatomic atlas of mouse dorsal raphe Pet1 neurons. *eLife*, *9*. <https://doi.org/10.7554/eLife.55523>
- Olsen, R. W., & Liang, J. (2017). Role of GABAA receptors in alcohol use disorders suggested by chronic intermittent ethanol (CIE) rodent model. *Molecular Brain*, *10*(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s13041-017-0325-8>
- Pan, H.-Q., Liu, X.-X., He, Y., Zhou, J., Liao, C.-Z., You, W.-J., Jiang, S.-Y., Qin, X., Chen, W.-B., Fei, E.-K., Zhang, W.-H., & Pan, B.-X. (2022). Prefrontal GABAA (δ)R Promotes Fear Extinction through Enabling the Plastic Regulation of

Neuronal Intrinsic Excitability. *The Journal of Neuroscience*, 42(29), 5755–5770.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0689-22.2022>

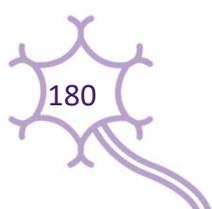
- Patestas, M. A., & Gartner, L. P. (2013). Cerebral Cortex. In *A Textbook of Neuroanatomy* (1st ed., pp. 398–425). Wiley-Blackwell.
- Paus, T., Zijdenbos, A., Worsley, K., Collins, D. L., Blumenthal, J., Giedd, J. N., Rapoport, J. L., & Evans, A. C. (1999). Structural Maturation of Neural Pathways in Children and Adolescents: In Vivo Study. *Science*, 283(5409), 1908–1911. <https://doi.org/10.1126/science.283.5409.1908>
- Peinado, J. M., Gomez-Capilla, J. A., & Mora, F. (1984). Cerebral cortex and amino acid neurotransmitters: Higher levels of aspartic acid but not GABA in the frontal cortex of the rat. *Brain Research Bulletin*, 12(6), 625–627. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(84\)90142-4](https://doi.org/10.1016/0361-9230(84)90142-4)
- Peñas-Cazorla, R., & Vilaró, M. T. (2015). Serotonin 5-HT<sub>4</sub> receptors and forebrain cholinergic system: receptor expression in identified cell populations. *Brain Structure and Function*, 220(6), 3413–3434. <https://doi.org/10.1007/s00429-014-0864-z>
- Pérez, V., Gilaberte, I., Faries, D., Alvarez, E., & Artigas, F. (1997). Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of pindolol in combination with fluoxetine antidepressant treatment. *The Lancet*, 349(9065), 1594–1597. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)08007-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)08007-5)
- Perez-Caballero, L., Pérez-Egea, R., Romero-Grimaldi, C., Puigdemont, D., Molet, J., Caso, J.-R., Mico, J.-A., Pérez, V., Leza, J.-C., & Berrocoso, E. (2014). Early responses to deep brain stimulation in depression are modulated by anti-inflammatory drugs. *Molecular Psychiatry*, 19(5), 607–614. <https://doi.org/10.1038/mp.2013.63>
- Perlis, R. H., Brown, E., Baker, R. W., & Nierenberg, A. A. (2006). Clinical Features of Bipolar Depression Versus Major Depressive Disorder in Large Multicenter Trials. *American Journal of Psychiatry*, 163(2), 225–231. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.163.2.225>
- Petilla Interneuron Nomenclature Group, Ascoli, G. A., Alonso-Nanclares, L., Anderson, S. A., Barrionuevo, G., Benavides-Piccione, R., Burkhalter, A., Buzsáki, G., Cauli, B., Defelipe, J., Fairén, A., Feldmeyer, D., Fishell, G., Fregnac, Y., Freund, T. F., Gardner, D., Gardner, E. P., Goldberg, J. H., Helmstaedter, M., ... Yuste, R. (2008). Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(7), 557–568. <https://doi.org/10.1038/nrn2402>
- Petrides, M. (2000). The role of the mid-dorsolateral prefrontal cortex in working memory. *Experimental Brain Research*, 133(1), 44–54. <https://doi.org/10.1007/s002210000399>
- Piccinni, A., Marazziti, D., Catena, M., Domenici, L., del Debbio, A., Bianchi, C., Mannari, C., Martini, C., da Pozzo, E., Schiavi, E., Mariotti, A., Roncaglia, I., Palla, A., Consoli, G., Giovannini, L., Massimetti, G., & Dell’Osso, L. (2008). Plasma and serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients during 1 year of antidepressant treatments. *Journal of Affective Disorders*, 105(1–3), 279–283. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2007.05.005>
- Pompeiano, M., Palacios, J., & Mengod, G. (1992). Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT<sub>1A</sub> receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. *The Journal of Neuroscience*, 12(2), 440–453. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.12-02-00440.1992>
- Portella, M. J., de Diego-Adeliño, J., Ballesteros, J., Puigdemont, D., Oller, S., Santos, B., Álvarez, E., Artigas, F., & Pérez, V. (2011). Can We Really Accelerate and Enhance the Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Antidepressant Effect? *The Journal of Clinical Psychiatry*, 72(07), 962–969. <https://doi.org/10.4088/JCP.09m05827blu>
- Prouty, E. W., Chandler, D. J., & Waterhouse, B. D. (2017). Neurochemical differences between target-specific populations of rat dorsal raphe projection neurons. *Brain Research*, 1675, 28–40. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.08.031>



- Pruessner, M., Hellhammer, D. H., Pruessner, J. C., & Lupien, S. J. (2003). Self-reported depressive symptoms and stress levels in healthy young men: Associations with the cortisol response to awakening. *Psychosomatic Medicine*, *65*(1), 92–99. <https://doi.org/10.1097/01.PSY.0000040950.22044.10>
- Puig, M. V., Artigas, F., & Celada, P. (2005). Modulation of the activity of pyramidal neurons in rat prefrontal cortex by raphe stimulation in vivo: Involvement of serotonin and GABA. *Cerebral Cortex*, *15*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhh104>
- Puig, M. V., Celada, P., Díaz-Mataix, L., & Artigas, F. (2003). In vivo modulation of the activity of pyramidal neurons in the rat medial prefrontal cortex by 5-HT<sub>2A</sub> receptors: Relationship to thalamocortical afferents. *Cerebral Cortex*, *13*(8), 870–882. <https://doi.org/10.1093/cercor/13.8.870>
- Puig, M. V., & Gullledge, A. T. (2011). Serotonin and Prefrontal Cortex Function: Neurons, Networks, and Circuits. *Molecular Neurobiology*, *44*(3), 449–464. <https://doi.org/10.1007/s12035-011-8214-0>
- Puig, M. V., Santana, N., Celada, P., Mengod, G., & Artigas, F. (2004). In vivo excitation of GABA interneurons in the medial prefrontal cortex through 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Cerebral Cortex*, *14*(12), 1365–1375. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhh097>
- Puigdemont, D., Pérez-Egea, R., Portella, M. J., Molet, J., de Diego-Adeliño, J., Gironell, A., Radua, J., Gómez-Anson, B., Rodríguez, R., Serra, M., de Quintana, C., Artigas, F., Álvarez, E., & Pérez, V. (2012). Deep brain stimulation of the subcallosal cingulate gyrus: Further evidence in treatment-resistant major depression. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *15*(1), 121–133. <https://doi.org/10.1017/S1461145711001088>
- Puigdemont, D., Portella, M. J., Pérez-Egea, R., Molet, J., Gironell, A., de Diego-Adeliño, J., Martín, A., Rodríguez, R., Álvarez, E., Artigas, F., & Pérez, V. (2015). A randomized double-blind crossover trial of deep brain stimulation of the subcallosal cingulate gyrus in patients with treatment-resistant depression: a pilot study of relapse prevention. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, *40*(4), 224–231. <https://doi.org/10.1503/jpn.130295>
- Qi, J., Zhang, S., Wang, H.-L., Wang, H., de Jesus Aceves Buendia, J., Hoffman, A. F., Lupica, C. R., Seal, R. P., & Morales, M. (2014). A glutamatergic reward input from the dorsal raphe to ventral tegmental area dopamine neurons. *Nature Communications*, *5*(1), 5390. <https://doi.org/10.1038/ncomms6390>
- Quirk, G. J., Russo, G. K., Barron, J. L., & Lebron, K. (2000). The Role of Ventromedial Prefrontal Cortex in the Recovery of Extinguished Fear. *The Journal of Neuroscience*, *20*(16), 6225–6231. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-16-06225.2000>
- Ramirez-Mahaluf, J. P., Roxin, A., Mayberg, H. S., & Compte, A. (2015). A Computational Model of Major Depression: the Role of Glutamate Dysfunction on Cingulo-Frontal Network Dynamics. *Cerebral Cortex*, bhv249. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhv249>
- Ren, J., Friedmann, D., Xiong, J., Liu, C. D., Ferguson, B. R., Weerakkody, T., DeLoach, K. E., Ran, C., Pun, A., Sun, Y., Weissbourd, B., Neve, R. L., Huguenard, J., Horowitz, M. A., & Luo, L. (2018). Anatomically Defined and Functionally Distinct Dorsal Raphe Serotonin Sub-systems. *Cell*, *175*(2), 472–487.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.043>
- Ren, J., Isakova, A., Friedmann, D., Zeng, J., Grutzner, S. M., Pun, A., Zhao, G. Q., Kolluru, S. S., Wang, R., Lin, R., Li, P., Li, A., Raymond, J. L., Luo, Q., Luo, M., Quake, S. R., & Luo, L. (2019). Single-cell transcriptomes and whole-brain projections of serotonin neurons in the mouse dorsal and median raphe nuclei. *ELife*, *8*, 1–36. <https://doi.org/10.7554/eLife.49424>
- Riga, M. S., Sánchez, C., Celada, P., & Artigas, F. (2016). Involvement of 5-HT<sub>3</sub> receptors in the action of vortioxetine in rat brain: Focus on glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *Neuropharmacology*, *108*, 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.04.023>
- Riga, M. S., Teruel-Martí, V., Sánchez, C., Celada, P., & Artigas, F. (2017). Subchronic vortioxetine treatment –but not escitalopram– enhances pyramidal neuron activity in the rat prefrontal cortex. *Neuropharmacology*, *113*, 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.09.024>

- Rigucci, S., Serafini, G., Pompili, M., Kotzalidis, G., & Tatarelli, R. (2009). Anatomical and functional correlates in major depressive disorder: The contribution of neuroimaging studies. *World Journal of Biological Psychiatry*, 1–16. <https://doi.org/10.1080/15622970903131571>
- Ripke, S., Wray, N. R., Lewis, C. M., Hamilton, S. P., Weissman, M. M., Breen, G., Byrne, E. M., Blackwood, D. H. R., Boomsma, D. I., Cichon, S., Heath, A. C., Holsboer, F., Lucae, S., Madden, P. A. F., Martin, N. G., McGuffin, P., Muglia, P., Noethen, M. M., Penninx, B. P., ... Sullivan, P. F. (2013). A mega-analysis of genome-wide association studies for major depressive disorder. *Molecular Psychiatry*, 18(4), 497–511. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.21>
- Riva-Posse, P., Crowell, A. L., Wright, K., Waters, A. C., Choi, K. S., Garlow, S. J., Holtzheimer, P. E., Gross, R. E., & Mayberg, H. S. (2020). Rapid Antidepressant Effects of Deep Brain Stimulation and Their Relation to Surgical Protocol. *Biological Psychiatry*, 88(8), e37–e39. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2020.03.017>
- Robbins, T. W., & Arnsten, A. F. T. (2009). The neuropsychopharmacology of fronto-executive function: Monoaminergic modulation. *Annual Review of Neuroscience*, 32, 267–287. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135535>
- Rubio-Garrido, P., Pérez-de-Manzo, F., Porrero, C., Galazo, M. J., & Clascá, F. (2009). Thalamic Input to Distal Apical Dendrites in Neocortical Layer 1 Is Massive and Highly Convergent. *Cerebral Cortex*, 19(10), 2380–2395. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhn259>
- Rudebeck, P. H., & Rich, E. L. (2018). Primer: The Orbitofrontal cortex. *Current Biology : CB*, 28(18), R1083–R1088. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.07.018>
- Rush, A. J., Trivedi, M. H., Wisniewski, S. R., Nierenberg, A. A., Stewart, J. W., Warden, D., Niederehe, G., Thase, M. E., Lavori, P. W., Lebowitz, B. D., McGrath, P. J., Rosenbaum, J. F., Sackeim, H. A., Kupfer, D. J., Luther, J., & Fava, M. (2006). Acute and Longer-Term Outcomes in Depressed Outpatients Requiring One or Several Treatment Steps: A STAR\*D Report. *American Journal of Psychiatry*, 163(11), 1905–1917. <https://doi.org/10.1176/ajp.2006.163.11.1905>
- Saffari, R., Teng, Z., Zhang, M., Kravchenko, M., Hohoff, C., Ambrée, O., & Zhang, W. (2016). NPY+/-, but not PV+ GABAergic neurons mediated long-range inhibition from infra- to prelimbic cortex. *Translational Psychiatry*, 6, e736. <https://doi.org/10.1038/tp.2016.7>
- Sakagami, M., & Pan, X. (2007). Functional role of the ventrolateral prefrontal cortex in decision making. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 17, Issue 2, pp. 228–233). <https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.02.008>
- Saleh, K., Carballedo, A., Lisiecka, D., Fagan, A. J., Connolly, G., Boyle, G., & Frodl, T. (2012). Impact of family history and depression on amygdala volume. *Psychiatry Research: Neuroimaging*, 203(1), 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.psychresns.2011.10.004>
- Sanchez, C., Asin, K. E., & Artigas, F. (2015). Vortioxetine, a novel antidepressant with multimodal activity: Review of preclinical and clinical data. *Pharmacology and Therapeutics*, 145, 43–57. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.07.001>
- Sani, G., Janiri, D., di Nicola, M., Janiri, L., Ferretti, S., & Chieffo, D. (2020). Mental health during and after the COVID19 emergency in Italy. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 74(6), 372–372. <https://doi.org/10.1111/pcn.13004>
- Santana, N., & Artigas, F. (2017a). Expression of Serotonin 2C Receptors in Pyramidal and GABAergic Neurons of Rat Prefrontal Cortex: A Comparison with Striatum. *Cerebral Cortex*, 27(6), 3125–3139. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhw148>
- Santana, N., & Artigas, F. (2017b). Laminar and cellular distribution of monoamine receptors in rat medial prefrontal cortex. *Frontiers in Neuroanatomy*, 11(September), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00087>
- Santana, N., Bortolozzi, A., Serrats, J., Mengod, G., & Artigas, F. (2004). Expression of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cerebral Cortex*, 14(10), 1100–1109. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhh070>

- Sargin, D., Jeoung, H.-S., Goodfellow, N. M., & Lambe, E. K. (2019). Serotonin Regulation of the Prefrontal Cortex: Cognitive Relevance and the Impact of Developmental Perturbation. *ACS Chemical Neuroscience*, *10*(7), 3078–3093. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.9b00073>
- Sarter, M., & Bruno, J. P. (2002). The neglected constituent of the basal forebrain corticopetal projection system: GABAergic projections. *European Journal of Neuroscience*, *15*(12), 1867–1873. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02004.x>
- Saura, J., Bleuel, Z., Ulrich, J., Mendelowitsch, A., Chen, K., Shih, J. C., Malherbe, P., da Prada, M., & Richards, J. G. (1996). Molecular neuroanatomy of human monoamine oxidases A and B revealed by quantitative enzyme radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience*, *70*(3), 755–774. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(96\)83013-2](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(96)83013-2)
- Saura, J., Kettler, R., da Prada, M., & Richards, J. (1992). Quantitative enzyme radioautography with 3H-Ro 41-1049 and 3H-Ro 19-6327 in vitro: localization and abundance of MAO-A and MAO-B in rat CNS, peripheral organs, and human brain. *The Journal of Neuroscience*, *12*(5), 1977–1999. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.12-05-01977.1992>
- Saveanu, R. v., & Nemeroff, C. B. (2012). Etiology of Depression: Genetic and Environmental Factors. *Psychiatric Clinics of North America*, *35*(1), 51–71. <https://doi.org/10.1016/j.psc.2011.12.001>
- Schmaal, L., Veltman, D. J., van Erp, T. G. M., Smann, P. G., Frodl, T., Jahanshad, N., Loehrer, E., Tiemeier, H., Hofman, A., Niessen, W. J., Vernooij, M. W., Ikram, M. A., Wittfeld, K., Grabe, H. J., Block, A., Hegenscheid, K., Völzke, H., Hoehn, D., Czisch, M., ... Hibar, D. P. (2016). Subcortical brain alterations in major depressive disorder: Findings from the ENIGMA Major Depressive Disorder working group. *Molecular Psychiatry*, *21*(6), 806–812. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.69>
- Schotte, C. K. W., van den Bossche, B., de Doncker, D., Claes, S., & Cosyns, P. (2006). A biopsychosocial model as a guide for psychoeducation and treatment of depression. *Depression and Anxiety*, *23*(5), 312–324. <https://doi.org/10.1002/da.20177>
- Sego, C., Gonçalves, L., Lima, L., Furigo, I. C., Donato, J., & Metzger, M. (2014). Lateral habenula and the rostromedial tegmental nucleus innervate neurochemically distinct subdivisions of the dorsal raphe nucleus in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, *522*(7), 1454–1484. <https://doi.org/10.1002/cne.23533>
- Seifinejad, A., Li, S., Possovre, M.-L., Vassalli, A., & Tafti, M. (2020). Hypocretinergic interactions with the serotonergic system regulate REM sleep and cataplexy. *Nature Communications*, *11*(1), 6034. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19862-y>
- Semenkovich, K., Brown, M. E., Svrakic, D. M., & Lustman, P. J. (2015). Depression in Type 2 Diabetes Mellitus: Prevalence, Impact, and Treatment. *Drugs*, *75*(6), 577–587. <https://doi.org/10.1007/s40265-015-0347-4>
- Seo, D., Funderburk, S. C., Bhatti, D. L., Motard, L. E., Newbold, D., Girven, K. S., McCall, J. G., Krashes, M., Sparta, D. R., & Bruchas, M. R. (2016). A GABAergic Projection from the Centromedial Nuclei of the Amygdala to Ventromedial Prefrontal Cortex Modulates Reward Behavior. *The Journal of Neuroscience*, *36*(42), 10831–10842. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1164-16.2016>
- Shamay-Tsoory, S. G., Aharon-Peretz, J., & Perry, D. (2009). Two systems for empathy: a double dissociation between emotional and cognitive empathy in inferior frontal gyrus versus ventromedial prefrontal lesions. *Brain*, *132*(3), 617–627. <https://doi.org/10.1093/brain/awn279>
- Sharkey, L. M., Madamba, S. G., Siggins, G. R., & Bartfai, T. (2008). Galanin alters GABAergic neurotransmission in the dorsal raphe nucleus. *Neurochemical Research*, *33*(2), 285–291. <https://doi.org/10.1007/s11064-007-9524-5>
- Sharp, T., McQuade, R., Bramwell, S., & Hjorth, S. (1993). Effect of acute and repeated administration of 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists on 5-HT release in rat brain in vivo. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *348*(4). <https://doi.org/10.1007/BF00171331>



- Shen, Q., Lal, R., Luellen, B. A., Earnheart, J. C., Andrews, A. M., & Luscher, B. (2010).  $\gamma$ -Aminobutyric Acid-Type A Receptor Deficits Cause Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Hyperactivity and Antidepressant Drug Sensitivity Reminiscent of Melancholic Forms of Depression. *Biological Psychiatry*, *68*(6), 512–520. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.04.024>
- Shikanai, H., Yoshida, T., Konno, K., Yamasaki, M., Izumi, T., Ohmura, Y., Watanabe, M., & Yoshioka, M. (2012). Distinct Neurochemical and Functional Properties of GAD67-Containing 5-HT Neurons in the Rat Dorsal Raphe Nucleus. *Journal of Neuroscience*, *32*(41), 14415–14426. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5929-11.2012>
- Simon, G. E., Savarino, J., Operskalski, B., & Wang, P. S. (2006). Suicide Risk During Antidepressant Treatment. *American Journal of Psychiatry*, *163*(1), 41–47. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.163.1.41>
- Soffin, E. M., Gill, C. H., Brough, S. J., Jerman, J. C., & Davies, C. H. (2004). Pharmacological characterisation of the orexin receptor subtype mediating postsynaptic excitation in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropharmacology*, *46*(8), 1168–1176. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.02.014>
- Soiza-Reilly, M., & Commons, K. G. (2011). Glutamatergic drive of the dorsal raphe nucleus. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, *41*(4), 247–255. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2011.04.004>
- Solmi, M., Radua, J., Olivola, M., Croce, E., Soardo, L., Salazar de Pablo, G., il Shin, J., Kirkbride, J. B., Jones, P., Kim, J. H., Kim, J. Y., Carvalho, A. F., Seeman, M. v., Correll, C. U., & Fusar-Poli, P. (2022). Age at onset of mental disorders worldwide: large-scale meta-analysis of 192 epidemiological studies. *Molecular Psychiatry*, *27*(1), 281–295. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01161-7>
- Somogyi, P., Tamás, G., Lujan, R., & Buhl, E. H. (1998). Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain Research Reviews*, *26*(2–3), 113–135. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(97\)00061-1](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(97)00061-1)
- Song, L., Wu, X., Wang, J., Guan, Y., Zhang, Y., Gong, M., Wang, Y., & Li, B. (2021). Antidepressant effect of catalpol on corticosterone-induced depressive-like behavior involves the inhibition of HPA axis hyperactivity, central inflammation and oxidative damage probably via dual regulation of NF- $\kappa$ B and Nrf2. *Brain Research Bulletin*, *177*, 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2021.09.002>
- Spies, M., Knudsen, G. M., Lanzenberger, R., & Kasper, S. (2015). The serotonin transporter in psychiatric disorders: insights from PET imaging. *The Lancet Psychiatry*, *2*(8), 743–755. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(15\)00232-1](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(15)00232-1)
- Spijker, J., de Graaf, R., Bijl, R. v., Beekman, A. T. F., Ormel, J., & Nolen, W. A. (2002). Duration of major depressive episodes in the general population: Results from the Netherlands Mental Health Survey and Incidence Study (NEMESIS). *British Journal of Psychiatry*, *181*(3), 208–213. <https://doi.org/10.1192/bjp.181.3.208>
- Srejic, L. R., Hamani, C., & Hutchison, W. D. (2015). High-frequency stimulation of the medial prefrontal cortex decreases cellular firing in the dorsal raphe. *European Journal of Neuroscience*, *41*(9), 1219–1226. <https://doi.org/10.1111/ejn.12856>
- Srejic, L. R., Wood, K. M., Zeqja, A., Hashemi, P., & Hutchison, W. D. (2016). Modulation of serotonin dynamics in the dorsal raphe nucleus via high frequency medial prefrontal cortex stimulation. *Neurobiology of Disease*, *94*, 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.06.009>
- Stahl, S. M. (2000). Placebo-controlled comparison of the selective serotonin reuptake inhibitors citalopram and sertraline. *Biological Psychiatry*, *48*(9), 894–901. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(00\)00957-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(00)00957-4)
- Steinbusch, H. W. M., Dolatkhah, M. A., & Hopkins, D. A. (2021). Anatomical and neurochemical organization of the serotonergic system in the mammalian brain and in particular the involvement of the dorsal raphe nucleus in relation to neurological diseases. In *Progress in Brain Research* (Vol. 261, pp. 41–81). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2021.02.003>
- Stockmeier, C. A., Shapiro, L. A., Dilley, G. E., Kolli, T. N., Friedman, L., & Rajkowska, G. (1998). Increase in Serotonin-1A Autoreceptors in the Midbrain of Suicide Victims with Major Depression—Postmortem Evidence for Decreased Serotonin Activity. *The Journal of Neuroscience*, *18*(18), 7394–7401. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-18-07394.1998>

- Sullivan, G. M., Ogden, R. T., Oquendo, M. A., Kumar, J. S. D., Simpson, N., Huang, Y., Mann, J. J., & Parsey, R. v. (2009). Positron Emission Tomography Quantification of Serotonin-1A Receptor Binding in Medication-Free Bipolar Depression. *Biological Psychiatry*, *66*(3), 223–230. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.01.028>
- Svoboda, E., McKinnon, M. C., & Levine, B. (2006). The functional neuroanatomy of autobiographical memory: A meta-analysis. *Neuropsychologia*, *44*(12), 2189–2208. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2006.05.023>
- Szot, P., White, S. S., Greenup, J. L., Leverenz, J. B., Peskind, E. R., & Raskind, M. A. (2007). Changes in adrenoreceptors in the prefrontal cortex of subjects with dementia: evidence of compensatory changes. *Neuroscience*, *146*(1), 471–480. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.01.031>
- Takagishi, M., & Chiba, T. (1991). Efferent projections of the infralimbic (area 25) region of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tracer PHA-L study. *Brain Research*, *566*(1–2), 26–39. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91677-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91677-5)
- Thase, M. E., Entsuah, A. R., & Rudolph, R. L. (2001). Remission rates during treatment with venlafaxine or selective serotonin reuptake inhibitors. *British Journal of Psychiatry*, *178*(3), 234–241. <https://doi.org/10.1192/bjp.178.3.234>
- Thomson, A. M. (2010). Neocortical layer 6, a review. *Frontiers in Neuroanatomy*. <https://doi.org/10.3389/fnana.2010.00013>
- Tollefson, G. D., & Holman, S. L. (1994). How long to onset of antidepressant action: a meta-analysis of patients treated with fluoxetine or placebo. *International Clinical Psychopharmacology*, *9*(4), 245–250. <https://doi.org/10.1097/00004850-199400940-00003>
- Tousoulis, D., Drolias, A., Antoniadis, C., Vasiliadou, C., Marinou, K., Latsios, G., Stefanadi, E., Gounari, P., Siasos, G., Papageorgiou, N., Trikas, A., & Stefanadis, C. (2009). Antidepressive treatment as a modulator of inflammatory process in patients with heart failure: Effects on proinflammatory cytokines and acute phase protein levels. *International Journal of Cardiology*, *134*(2), 238–243.
- Trivedi, M. H., Fava, M., Wisniewski, S. R., Thase, M. E., Quitkin, F., Warden, D., Ritz, L., Nierenberg, A. A., Lebowitz, B. D., Biggs, M. M., Luther, J. F., Shores-Wilson, K., & Rush, A. J. (2006). Medication Augmentation after the Failure of SSRIs for Depression. *New England Journal of Medicine*, *354*(12), 1243–1252. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa052964>
- Trivedi, M. H., Rush, A. J., Wisniewski, S. R., Nierenberg, A. A., Warden, D., Ritz, L., Norquist, G., Howland, R. H., Lebowitz, B., McGrath, P. J., Shores-Wilson, K., Biggs, M. M., Balasubramani, G. K., & Fava, M. (2006). Evaluation of Outcomes With Citalopram for Depression Using Measurement-Based Care in STAR\*D: Implications for Clinical Practice. *American Journal of Psychiatry*, *163*(1), 28–40. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.163.1.28>
- Ulfing, N. (2002). Cerebral Cortex: Molecular Layer (Layer I). In *Calcium-Binding Proteins in the Human Developing Brain. Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology* (Vol. 165, pp. 25–27). Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-59425-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-642-59425-0_4)
- Urrutia-Piñones, J., Morales-Moraga, C., Sanguinetti-González, N., Escobar, A. P., & Chiu, C. Q. (2022). Long-Range GABAergic Projections of Cortical Origin in Brain Function. *Frontiers in Systems Neuroscience*, *16*. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2022.841869>
- van Aerde, K. I., Heistek, T. S., & Mansvelder, H. D. (2008). Prelimbic and Infralimbic Prefrontal Cortex Interact during Fast Network Oscillations. *PLoS ONE*, *3*(7), e2725. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002725>
- van Cauwenberge, M. G. A., Bouckaert, F., Vansteelandt, K., Adamson, C., de Winter, F. L., Sienaert, P., van den Stock, J., Dols, A., Rhebergen, D., Stek, M. L., Emsell, L., & Vandenbulcke, M. (2021). A longitudinal study of the association between basal ganglia volumes and psychomotor symptoms in subjects with late life depression undergoing ECT. *Translational Psychiatry*, *11*(1), 199. <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01314-w>

- Varga, V., Székely, A. D., Csillag, A., Sharp, T., & Hajós, M. (2001). Evidence for a role of GABA interneurons in the cortical modulation of midbrain 5-hydroxytryptamine neurones. *Neuroscience*, *106*(4), 783–792. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00294-9](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00294-9)
- Vázquez, C., & Sanz, J. (2020). Trastornos depresivos. In A. Belloch, B. Sandín, & F. Ramos (Eds.), *Manual de psicopatología: Vol. II* (3rd ed., pp. 199–227). McGraw-Hill.
- Veerakumar, A., Challis, C., Gupta, P., Da, J., Upadhyay, A., Beck, S. G., & Berton, O. (2014). Antidepressant-like Effects of Cortical Deep Brain Stimulation Coincide With Pro-neuroplastic Adaptations of Serotonin Systems. *Biological Psychiatry*, *76*(3), 203–212. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.12.009>
- Verduijn, J., Verhoeven, J. E., Milaneschi, Y., Schoevers, R. A., van Hemert, A. M., Beekman, A. T. F., & Penninx, B. W. J. H. (2017). Reconsidering the prognosis of major depressive disorder across diagnostic boundaries: full recovery is the exception rather than the rule. *BMC Medicine*, *15*(1), 215. <https://doi.org/10.1186/s12916-017-0972-8>
- Vertes, R. P. (2004). Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse (New York, N.Y.)*, *51*(1), 32–58. <https://doi.org/10.1002/syn.10279>
- Vitalis, T., Ansorge, M. S., & Dayer, A. G. (2013). Serotonin homeostasis and serotonin receptors as actors of cortical construction: special attention to the 5-HT<sub>3A</sub> and 5-HT<sub>6</sub> receptor subtypes. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00093>
- Vos, T., Barber, R. M., Bell, B., Bertozzi-Villa, A., Biryukov, S., Bolliger, I., Charlson, F., Davis, A., Degenhardt, L., Dicker, D., Duan, L., Erskine, H., Feigin, V. L., Ferrari, A. J., Fitzmaurice, C., Fleming, T., Graetz, N., Guinovart, C., Haagsma, J., ... Murray, C. J. (2015). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*, *386*(9995), 743–800. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60692-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60692-4)
- Wang, H., Xia, Q., Xiong, Z., Li, Z., Xiang, W., Yuan, Y., Liu, Y., & Li, Z. (2020). The psychological distress and coping styles in the early stages of the 2019 coronavirus disease (COVID-19) epidemic in the general mainland Chinese population: A web-based survey. *PLOS ONE*, *15*(5), e0233410. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233410>
- Wang, J.-W., David, D. J., Monckton, J. E., Battaglia, F., & Hen, R. (2008). Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *28*(6), 1374–1384. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3632-07.2008>
- Wang, Q.-P., Koyama, Y., Guan, J.-L., Takahashi, K., Kayama, Y., & Shioda, S. (2005). The orexinergic synaptic innervation of serotonin- and orexin 1-receptor-containing neurons in the dorsal raphe nucleus. *Regulatory Peptides*, *126*(1–2), 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2004.08.030>
- Wang, R. Y., & Aghajani, G. K. (1977). Antidromically identified serotonergic neurons in the rat midbrain raphe: evidence for collateral inhibition. *Brain Research*, *132*(1), 186–193. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(77\)90719-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(77)90719-3)
- Warden, M. R., Selimbeyoglu, A., Mirzabekov, J. J., Lo, M., Thompson, K. R., Kim, S., Adhikari, A., Tye, K. M., Frank, L. M., & Deisseroth, K. (2012). A prefrontal cortex-brainstem neuronal projection that controls response to behavioural challenge. *Nature*, *492*(7429), 428–432. <https://doi.org/10.1038/nature11617.A>
- Watanabe, M., Uematsu, A., & Johansen, J. P. (2021). Enhanced synchronization between prelimbic and infralimbic cortices during fear extinction learning. *Molecular Brain*, *14*(1), 175. <https://doi.org/10.1186/s13041-021-00884-6>
- Waytz, A., Zaki, J., & Mitchell, J. P. (2012). Response of dorsomedial prefrontal cortex predicts altruistic behavior. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *32*(22), 7646–7650. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6193-11.2012>
- Weissbourd, B., Ren, J., DeLoach, K. E., Guenther, C. J., Miyamichi, K., & Luo, L. (2014). Presynaptic Partners of Dorsal Raphe Serotonergic and GABAergic Neurons. *Neuron*, *83*(3), 645–662. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.06.024>
- Wimbiscus, M., Kostenko, O., & Malone, D. (2010). MAO inhibitors: Risks, benefits, and lore. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, *77*(12), 859–882. <https://doi.org/10.3949/ccjm.77a.09103>

- Wittmann, M. K., Trudel, N., Trier, H. A., Klein-Flügge, M. C., Sel, A., Verhagen, L., & Rushworth, M. F. S. (2021). Causal manipulation of self-other mergence in the dorsomedial prefrontal cortex. *Neuron*, *109*(14), 2353-2361.e11. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.05.027>
- Wood, J., Kim, Y., & Moghaddam, B. (2012). Disruption of prefrontal cortex large scale neuronal activity by different classes of psychotomimetic drugs. *Journal of Neuroscience*, *32*(9), 3022–3031. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6377-11.2012>
- Wotherspoon, G., Albert, M., Rattray, M., & Priestley, J. v. (1994). Serotonin and NADPH-diaphorase in the dorsal raphe nucleus of the adult rat. *Neuroscience Letters*, *173*(1–2), 31–36. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)90143-0](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)90143-0)
- Wray, N. R., Pergadia, M. L., Blackwood, D. H. R., Penninx, B. W. J. H., Gordon, S. D., Nyholt, D. R., Ripke, S., MacIntyre, D. J., McGhee, K. A., Maclean, A. W., Smit, J. H., Hottenga, J. J., Willemsen, G., Middeldorp, C. M., de Geus, E. J. C., Lewis, C. M., McGuffin, P., Hickie, I. B., van den Oord, E. J. C. G., ... Sullivan, P. F. (2012). Genome-wide association study of major depressive disorder: new results, meta-analysis, and lessons learned. *Molecular Psychiatry*, *17*(1), 36–48. <https://doi.org/10.1038/mp.2010.109>
- Xia, X., Li, Y., Wang, Y., Xia, J., Lin, Y., Zhang, X., Liu, Y., & Zhang, J. (2021). Functional role of dorsolateral prefrontal cortex in the modulation of cognitive bias. *Psychophysiology*, *58*(10). <https://doi.org/10.1111/psyp.13894>
- Xiang, Z., & Prince, D. A. (2003). Heterogeneous actions of serotonin on interneurons in rat visual cortex. *Journal of Neurophysiology*, *89*(3), 1278–1287. <https://doi.org/10.1152/jn.00533.2002>
- Xu, W., & Südhof, T. C. (2013). A Neural Circuit for Memory Specificity and Generalization. *Science*, *339*(6125), 1290–1295. <https://doi.org/10.1126/science.1229534>
- Yin, Y.-Y., Wang, Y.-H., Liu, W.-G., Yao, J.-Q., Yuan, J., Li, Z.-H., Ran, Y.-H., Zhang, L.-M., & Li, Y.-F. (2021). The role of the excitation:inhibition functional balance in the mPFC in the onset of antidepressants. *Neuropharmacology*, *191*, 108573. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108573>
- Yuan, X., Chen, B., Duan, Z., Xia, Z., Ding, Y., Chen, T., Liu, H., Wang, B., Yang, B., Wang, X., Liu, S., Zhou, J. Y., Liu, Y., Wang, Q., Shen, Z., Xiao, J., Shang, H., Liu, W., Shi, G., ... Chen, Y. (2021). Depression and anxiety in patients with active ulcerative colitis: crosstalk of gut microbiota, metabolomics and proteomics. *Gut Microbes*, *13*(1). <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1987779>
- Zarate, C. A., Singh, J. B., Carlson, P. J., Brutsche, N. E., Ameli, R., Luckenbaugh, D. A., Charney, D. S., & Manji, H. K. (2006). A Randomized Trial of an N-methyl-D-aspartate Antagonist in Treatment-Resistant Major Depression. *Archives of General Psychiatry*, *63*(8), 856. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.63.8.856>
- Zecevic, N., & Rakic, P. (2001). Development of Layer I Neurons in the Primate Cerebral Cortex. *The Journal of Neuroscience*, *21*(15), 5607–5619. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-15-05607.2001>
- Zhang, Y., Chen, Y., & Ma, L. (2018). Depression and cardiovascular disease in elderly: Current understanding. *Journal of Clinical Neuroscience*, *47*, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2017.09.022>
- Zhou, F. M., & Hablitz, J. J. (1999). Activation of serotonin receptors modulates synaptic transmission in rat cerebral cortex. *Journal of Neurophysiology*, *82*(6), 2989–2999. <https://doi.org/10.1152/jn.1999.82.6.2989>