

Artículo original

# **Modelos animales de depleción de serotonina: efectos sobre el proceso de neurogénesis adulta hipocampal**

## ***Animal models of serotonin depletion: effect on adult hippocampal neurogenesis***

**Rocío B. Foltran<sup>1</sup> & Silvina L. Diaz<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Instituto de Biología Celular y Neurociencias Prof. E. De Robertis, CONICET-UBA, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. República Argentina.

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad de Morón. República Argentina.

Manuscrito recibido: 20 de febrero de 2018; aceptado para publicación: 13 junio de 2018

Autor de contacto: Silvina L. Diaz.

Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad de Morón.

Cabildo 134, CP1708-Morón, Prov. de Buenos Aires, República Argentina.

E-mail: silvinalauradiaz@yahoo.com.ar

### **Resumen**

El proceso de generación de nuevas neuronas en áreas específicas del sistema nervioso central de los mamíferos no deja de fascinar a la comunidad científica, ya que permite vislumbrar un potencial terapéutico para patologías neurodegenerativas o psiquiátricas que hoy no tienen cura. Por esta razón, resulta de sumo interés el estudio de los mecanismos que permiten la regulación de las distintas etapas del proceso de generación de nuevas neuronas (neurogénesis). En particular, el sistema serotoninérgico ha sido vinculado con la modulación de la neurogénesis en el hipocampo adulto, a partir de descubrimientos que mostraban que el aumento de serotonina inducido por antidepresivos serotoninérgicos aumentaba la misma. Asimismo, se ha demostrado que, paradójicamente, la depleción de serotonina a nivel del sistema nervioso también potencia algunas etapas del proceso de neurogénesis. Estos resultados, aparentemente contradictorios, hacen pensar que la neurogénesis se sostiene en un delicado equilibrio en el que cada etapa podría ser sensible a la estimulación de diversos tipos de receptores serotoninérgicos, que a su vez son sensibles a diferentes niveles de serotonina. Los modelos clásicos de depleción de serotonina eran de tipo farmacológico, pero en la última década, surgieron numerosos modelos de animales hiposerotoninérgicos por modificaciones genéticas. Esta revisión, recopila cómo se ve afectado el proceso de neurogénesis del hipocampo adulto de roedores, en diversos modelos de depleción de serotonina tanto farmacológicos como genéticos.

**Palabras clave:** sobrevida neuronal, giro dentado, depleción serotoninérgica, modelos animales

## **Abstract**

*The process of generation of newborn neurons in specific areas of the central nervous system of mammals continues to fascinate the scientific community, since it allows to glimpse a therapeutic potential for neurodegenerative and / or psychiatric pathologies for which, up to now, there is no cure. Therefore, the study of the mechanisms that regulate the multistep process of neurogenesis is of great interest. Particularly, the serotonergic system has been linked to the modulation of neurogenesis in the adult hippocampus. Indeed a great body of studies has shown that the different stages of neurogenesis, i.e. proliferation, survival, etc. can be facilitated by higher serotonin neurotransmission after administration of serotonergic antidepressants. Likewise, it has been shown that depletion of central serotonin also enhances some stages of the neurogenesis process. These results, apparently contradictory, lead us to believe that neurogenesis is sustained in a delicate balance in which each stage could be sensitive to the stimulation of different types of serotonergic receptors, which in turn are sensible to different levels of serotonin. Classical models of serotonin depletion were pharmacological, but in the last decade, numerous models of hyposerotonergic animals were developed by genetic modifications. This review compiles how the process of neurogenesis in the adult hippocampus is modified in different animal models of pharmacological or genetic serotonin depletion.*

**Keywords:** neuronal survival, dentate gyrus, serotonergic depletion, animal models

## **Introducción**

Con la prolongación de la expectativa de vida en los tiempos que corren, muchas patologías pasaron a tener un rol preponderante dentro del abanico de enfermedades que ocurren a edad avanzada. Entre ellas, enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson y ciertas demencias, son cada vez más estudiadas para poder conocer en detalle sus mecanismos etiopatológicos, así como las posibilidades de acercarse a un tratamiento. Las alternativas para reemplazar las neuronas que se pierden como consecuencia de estos procesos neurodegenerativos se centran en 2 estrategias: los trasplantes exógenos de células nerviosas o el aprovechamiento de los nichos celulares con actividad regenerativa en el cerebro adulto (Boda *et al.*, 2017). Efectivamente, hay en el cerebro adulto un potencial neurogénico muy atractivo en vistas de su uso terapéutico, pero ello requiere un conocimiento profundo de la biología de este proceso fisiológico y su posible manipulación en condiciones patológicas.

## **El proceso de neurogénesis fisiológica**

Desde principios del siglo XX, la capacidad de regeneración de las células nerviosas en el cerebro adulto fue desestimada y esto se debió, en gran parte, a que el

premio Nobel Ramón y Cajal no había logrado probarlo con las herramientas disponibles en su época (Ramón y Cajal, 1928). Sin embargo algunos estudios en los años '60 y posteriores del joven Altman (Altman & Das, 1965) comenzaron a desafiar ese mito, mostrando que en roedores adultos las neuronas de áreas específicas eran capaces de dividirse por mitosis. Gracias a la microscopía electrónica, los trabajos de Kaplan mostraron que esas células posmitóticas tenían estructura y ultraestructura típica de neuronas (Kaplan, 1981, 1985; Kaplan & Hinds, 1977). El desarrollo de métodos cada vez más precisos y la extensión de estas investigaciones a especies variadas, deja en claro a principios del siglo XXI que el proceso de generación de nuevas neuronas ocurre de manera constitutiva en dos regiones del sistema nervioso central de los mamíferos: la zona subgranular del giro dentado (GD) del hipocampo y la zona subventricular, situada alrededor de los ventrículos laterales (Gross, 2000). En estas zonas, la neurogénesis tiene lugar de manera constitutiva en individuos adultos, con particularidades en cada una de ellas. Es interesante destacar que el proceso de neurogénesis puede ocurrir en otras zonas de forma reactiva, tal como ha sido revisado por E. Gould (Gould, 2007). Sin embargo, la generación de nuevas neuronas en áreas como la neocorteza, la amígdala,

el cuerpo estriado o la sustancia negra ha sido demostrada como consecuencia de daños en esos tejidos y no de manera constitutiva. Volviendo al proceso de neurogénesis constitutiva, las células que proliferan alrededor de los ventrículos laterales migran, a medida que se diferencian, por la vía rostral migratoria hacia los lóbulos olfatorios, para transformarse en su mayoría en células GABAérgicas y, en menor medida, dopaminérgicas (Pignatelli & Belluzzi, 2010). En contraposición, las células que proliferan en la zona subgranular, se diferencian a neuronas glutamatérgicas y migran en el espesor de la propia zona granular del GD. Estas células tienen una fisiología particular por lo cual en los días posteriores a su nacimiento responden a los *inputs* GABAérgicos despolarizándose. Luego, a las dos-tres semanas, comienzan a expresar receptores glutamatérgicos y entonces se modifica el gradiente de iones Cl<sup>-</sup>, por lo que la respuesta a los *inputs* GABAérgicos es la hiperpolarización (Marín-Burgin, Mongiat, Pardi, & Schinder, 2012). Alrededor de las seis semanas de edad, las nuevas neuronas ya reciben una alta densidad de *inputs* GABAérgicos, comparables con las neuronas maduras. En resumen, ese período típico de las neuronas inmaduras, en el que la excitación domina sobre la inhibición se modifica abruptamente en las neuronas “mayores”, en las cuales el balance se inclina hacia la inhibición. Así, el proceso continuo de neurogénesis adulta aporta una heterogeneidad constante al perfil electrofisiológico del GD (Lacar, Parylak, Vadodaria, Sarkar, & Gage, 2014). De esta información, se desprende la importancia de poder conocer la edad de las nuevas neuronas y para ello se emplean distintos marcadores de proliferación celular, de diferenciación celular (neuronal o glial) y de sobrevivencia. En general, la etapa de proliferación celular en esta región del sistema nervioso se lleva a cabo determinando la presencia de marcadores que indican que las células tienen entre 2 y 24 h de vida. El “*gold standard*” para medir proliferación celular corresponde a la detección de una molécula análoga al nucleótido timidina, la 5’bromo-2’deoxiuridina o BrdU. Esta molécula es administrada por vía parenteral o enteral a los animales y mientras esté presente en los tejidos (su vida media es de 2 h), es incorporada por todas aquellas células que estén atravesando el ciclo de división celular o mitosis, durante la fase S de síntesis de ADN. Luego, mediante la técnica de inmunohistoquímica

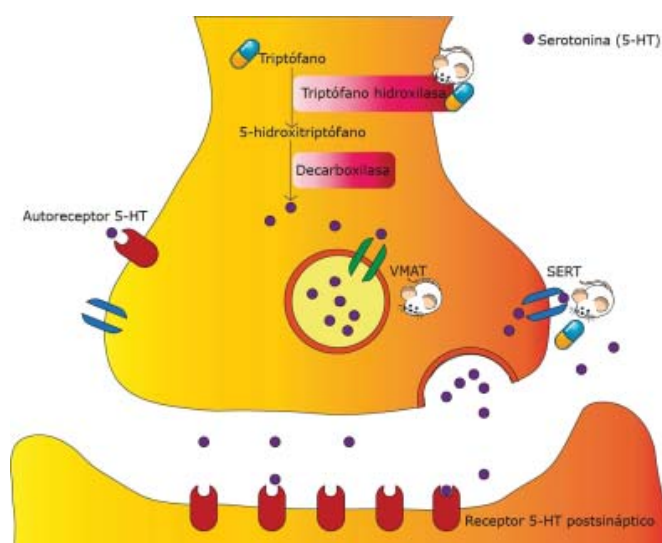
se pueden poner en evidencia las células positivas para el marcador exógeno BrdU y considerarlas como células de reciente división (Wojtowicz & Kee, 2006). Además, el BrdU es un marcador que también permite estudiar la sobrevivencia de las células, ya que luego de su administración se puede esperar más tiempo, generalmente cuatro semanas, antes de sacrificar los animales. Posteriormente, mediante inmunohistoquímica, se puede inferir que las células que son positivas para BrdU tienen cuatro semanas de edad o menos. Para estudiar la proliferación, existen también marcadores endógenos de división celular, como la proteína Ki67 que se expresa al final de la fase G1 del ciclo celular hasta el fin del ciclo mitótico. Una inmunohistoquímica para esta proteína, revela células positivas para Ki67, las cuales estaban proliferando al momento en que se sacrificó a los individuos. Existen otros marcadores endógenos de proliferación celular, como PCNA (del inglés *Proliferating cell nuclear antigen*) que se expresa mayormente en las fases G1 tardía y S, y el MCM-2 que se expresa entre G1 y M. Luego de la división celular, las células atraviesan diferentes etapas hasta convertirse en neuronas (Kempermann, Song, & Gage, 2015). Los precursores neuronales de la primera etapa se pueden dividir, por un lado, en células madre de aspecto glial o tipo 1 que expresan marcadores como GFAP (del inglés *glial fibrillary acidic protein*), Nestina y Sox2 y, por otro lado, células progenitoras que se amplifican de forma transitoria, incluyendo los tipos 2 y 3, que progresivamente dejan de expresar los anteriores y comienzan a expresar la molécula de adhesión PSA-NCAM y las proteínas doblecortina (Dcx), Neuro-D y Prox1. A continuación, las células neurales pasan a lo que se denomina “período de regulación” que puede subdividirse en una fase posmitótica temprana en la cual comienzan a expresar las proteínas calretinina y NeuN y pueden expresar aún los marcadores de las células tipo 3, y una fase posmitótica tardía, en la que expresan calbindina, NeuN, NeuroD y Prox1. Los primeros marcadores (de células tipo 1, 2 y 3) identifican neuronas inmaduras, mientras que el resto es expresado por neuronas maduras.

Si bien cada vez se conocen mejor las etapas y las características de este complejo proceso fisiológico, la atención está puesta hoy mayormente en conocer la importancia funcional de dicho proceso y la posibilidad de modularlo a través de diferentes intervenciones.

### El sistema serotoninérgico

La serotonina es una amina biógena que se sintetiza por acción de la enzima triptófano hidroxilasa (Tph) a partir de un aminoácido precursor, el triptófano. En 1937, esta amina fue descubierta originalmente en el aparato digestivo por los Dres. Erspamer y Vialli. Dado que actuaba estimulando la contracción intestinal, inicialmente la denominaron enteramina (Erspamer & Vialli, 1937). Sin embargo, fue en 1949 el año en que Maurice Rapport identifica la estructura química del vasoconstrictor sérico 5-hidroxitriptamina y, a partir de este momento, se la denomina serotonina (Rapport, 1949). Unos años más tarde, en 1964, se describió que la serotonina es sintetizada en un grupo de neuronas serotoninérgicas que se reúnen en grupos llamados B1-B9, específicamente, en el rafe (Dahlström & Fuxe, 1964). La serotonina se almacena en vesículas presinápticas e inicia su acción al ser liberada a la brecha sináptica. Los receptores serotoninérgicos, de los cuales se han descrito catorce subtipos se agrupan en siete tipos (del 1 al 7) y pueden ser pre- o, mayormente, postsinápticos. Esta importante variabilidad de subtipos de receptores serotoninérgicos aporta una enorme diversidad de respuestas para un mismo neurotransmisor. La acción de la serotonina finaliza al ser recaptada por el transportador de la serotonina (SERT o 5-HTT) que se ubica en la membrana presináptica. Una vez recaptada, la serotonina es transportada por el transportador vesicular de monoaminas (VMAT) hacia las vesículas donde vuelve a ser almacenada a nivel presináptico (Fig. 1). La serotonina también puede ser degradada intracelularmente a ácido 5-hidroxi-indolacético por acción de la enzima monoaminooxidasa A (MAOA). Dadas las funciones múltiples de la serotonina, numerosos fármacos que se utilizan en la actualidad, tienen como blanco el sistema serotoninérgico. En particular los antidepresivos del grupo de los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRSs) actúan bloqueando la acción del SERT, con lo cual la serotonina no puede ser recaptada en la terminal sináptica y persiste más tiempo en la sinapsis, prolongándose su acción. En efecto, la administración aguda de estos fármacos produce un aumento de los niveles de serotonina, pero su administración crónica provoca muchos y variados efectos neuroadaptativos a nivel neuroquímico, plástico y comportamental. En particular la administración de ISRSs por más de tres semanas genera un aumento de la neurogénesis en el hipocampo de roedores

(Encinas *et al.*, 2006; Malberg *et al.*, 2000), efecto que se ha observado en diferentes etapas del proceso neurogénico, como la proliferación de progenitores neurales y la supervivencia de las neuronas (Diaz *et al.*, 2012; Santarelli *et al.*, 2003). Este efecto de los ISRS ha sido reportado también tras la administración crónica en humanos (Boldrini *et al.*, 2009). Asimismo, se han demostrado efectos neurogénicos y conductuales similares a los inducidos por los ISRS, tras la administración crónica de fármacos agonistas de diversos receptores serotoninérgicos como el 5-HT<sub>1A</sub> (Santarelli *et al.*, 2003), 5-HT<sub>2B</sub> (Diaz *et al.*, 2012) y 5-HT<sub>4</sub> (Mendez-David *et al.*, 2014).



**Figura 1: Vía sináptica de la serotonina y sitios blanco de los modelos hiposerotoninérgicos.** La serotonina (5-HT) es sintetizada a partir del triptófano por la enzima triptófano hidroxilasa (Tph2), y luego es ingresada en vesículas de almacenamiento por el transportador vesicular de monoaminas (VMAT). Al liberarse al espacio sináptico, la serotonina puede interactuar con sus receptores pre- y postsinápticos, y luego ser recaptada por el transportador de 5-HT (SERT). La píldora simboliza aquellos lugares donde actúan las drogas utilizadas para los modelos farmacológicos, y los ratones blancos simbolizan las moléculas blanco de los modelos genéticos.

Las numerosas evidencias en favor de un efecto proneurogénico generado por tratamientos que provocan un aumento de la neurotransmisión serotoninérgica, con antidepresivos ISRS, hacía pensar que una disminución de la serotonina tendría efectos más bien inhibitorios sobre el

proceso de la neurogénesis hipocampal adulta. Los primeros estudios desafiando esta hipótesis mostraron resultados contradictorios, empleando modelos animales clásicos de depleción de serotonina. A posteriori, se desarrollaron diversos modelos de disminución de niveles de serotonina o deleción de células serotoninérgicas a través de animales transgénicos con pérdida o ganancia de función. En esta

revisión, se detallan los resultados sobre las distintas etapas del proceso de neurogénesis que se han obtenido en los últimos años con modelos de depleción serotoninérgica logrados a través de distintas estrategias, ya sea de ablación farmacológica o genética. Los mismos se resumen en la **Tabla I**.

**Tabla I. Características de los modelos animales de hiposerotonergia y los cambios en el proceso de neurogénesis.**

Resumen de las características de los modelos mencionados en el texto, el valor de la disminución de los niveles de serotonina y los cambios en la proliferación o en la sobrevida neuronal. Abreviaturas: d: días; s: semanas; m: meses; HC: hipocampo; CPF: corteza prefrontal; CM: cerebro medio; NC: no hay cambios; NA: no se analiza; NE: no se especifica; 5,7-DHT: 5,7-dihidroxitriptamina; PCPA: paraclorofenilalanina; 5-HTT; SERT: transportador de serotonina; Tph2: tirptófano hidroxilasa 2; VMAT2: transportador vesicular de monoaminas.

Artículo	Especie/Cepa	Edad	Modelo	Tiempo de depleción	% de depleción	% cambio proliferación	% cambio sobrevida
<i>Modelos Farmacológicos</i>							
Brezun & Daszuta 1999	Ratas	Adulta	5,7-DHT PCPA	8 inyecciones 4 d (2x300 y 2x100)	-	- 58.82% - 72.55%	- 35% - 53%
Brezun & Daszuta 2000	Ratas Wistar	8 s	5,7-DHT	1 inyección	75%	- 60%	- 46%
Brezun & Daszuta 2000	Ratas Wistar	Jóvenes 220 g	5,7-DHT	1 inyección	-	- 46%	- 50%
Banasr <i>et al.</i> 2001	Ratas Wistar	8 s	PCPA	2 días (1x300 y 1x100)	90-95%	- 35%	- 51%
Huang <i>et al.</i> 2005	Ratas Lister Hooded	300 g	5,7-DHT PCPA PCPA	1 inyección 3 días 14 días	80% 95% 97%	NC - 26,83% NC	NA
Ueda <i>et al.</i> 2005	Ratas Sprague-Dawley	8 s	5,7-DHT	1 inyección neonatal	Niveles no detectables	- 40%	NC
Jha <i>et al.</i> 2006	Ratas Wistar	Adultas (250 g)	PCPA 5,7-DHT	4 días 1 inyección	82% 80%	- 40% NC	- 37-54% + 60%
Diaz <i>et al.</i> 2013	Ratón C57BL/6	4 s	PCPA	8 s	70%	NC	+ 40%
<i>Modelos transgénicos constitutivos</i>							
Schmitt <i>et al.</i> 2007	Ratón C57BL/6	7 s, 3m, 14 m	5-HTT <sup>-/-</sup>	Toda la vida	-	+ 80% en los de 14 m	NC
Schipper <i>et al.</i> 2011	Ratas Wistar	65 d	5-HTT <sup>-/-</sup>	Toda la vida	-	NA	+ 78.57%
Sachs <i>et al.</i> 2013	Ratón C57/129	8-10 s	Tph2 KI R439H	Toda la vida	60-80%	NC	+ 37%



Klempin <i>et al.</i> 2013	L	6 s, 3 m, 1 año	Tph2 <sup>-/-</sup>	Toda la vida	-	+ 66% en los de 1 año	NA
Diaz <i>et al.</i> 2013	Ratón C57BL/6	7-8 s	Pet1 <sup>-/-</sup> VMAT2 <sup>fl/fl</sup> SERT <sup>cre/+</sup>	Toda la vida	80% 90-95%	NC NC	75% 400%
Karabeg <i>et al.</i> 2013	Ratón C57BL/6	6 m	5-HTT <sup>-/-</sup>	Toda la vida	-	+ 47%	26,7-53,8%
Jia <i>et al.</i> 2014	Ratón C57BL/6	3-5 m	Pet1-Cre; Lmx1b <sup>flx/flx</sup>	Toda la vida	-	NE	NE
Song <i>et al.</i> 2017	Ratón C57BL/6	340 d	Pet1-Cre; Tph2 <sup>flx/flx</sup>	Toda la vida	-	NA	+104%
<i>Modelos transgénicos inducibles</i>							
Jia <i>et al.</i> 2014	-	-	Pet1-Cre; Rosa26DTR	3-4 s	-	+ 27, 58%	+138%
Song <i>et al.</i> 2016	-	2,5 -3 m 1,5 m	Pet1-CreER <sup>T2</sup> ; Rosa26-DTA Pet1-CreER <sup>T2</sup> ; Tph2 <sup>flx/flx</sup>	1 m	86,7% 51,12%	+ 40-90% NA	+62-153% +33,33%
Song <i>et al.</i> 2017	-	2-2,5 m	Pet1-Cre; Rosa26DTR	3-4 s	-	NE	NE
<i>Otros modelos animales con déficits de serotonina</i>							
Zhang <i>et al.</i> 2006	Ratas Wistar	9 s	Dieta con 1/5 Trp	4 s	36% CPF 75% HC	- 40%	NA
Fournet <i>et al.</i> 2010	Ratón BALBc/129	3-5 m	STOP KO	Toda la vida	46% HC 35% CPF	- 28%	- 53%
Lesemann <i>et al.</i> 2012 y Pain <i>et al.</i>	Ratón C57Bl/6	5 s / 8-12 s	MPTP	1 o 5 d / 3 d – 10 d 3 d – 28 d	35-50% CM 40-70% HC	+ 97,74% + 181,82%	+ 167,27% + 223,53%
Kohl <i>et al.</i> 2016	Ratas	3 m	BAC $\alpha$ -sinucleína	Toda la vida	80% HC	NC	- 45.38%

## Modelos animales de depleción serotoninérgica

### Modelos farmacológicos

Los primeros trabajos en estudiar los efectos de la disminución de los niveles de serotonina en el cerebro se basaron en modelos farmacológicos, en particular

mediante el empleo de dos agentes. Por un lado, en 1972, la 5,7-dihidroxitriptamina (5,7-DHT) fue probada como neurotoxina con selectividad para las neuronas serotoninérgicas (Baumgarten & Lachenmayer, 1972), generando la muerte de las mismas, tras su inyección

en el rafe. Por otro lado, la paraclorofenilalanina (PCPA) es un inhibidor de la enzima limitante en la síntesis de serotonina, la Tph, y al administrarse de forma sistémica, depleta las vesículas de serotonina (Jéquier *et al.*, 1967). La enzima Tph posee dos isoformas: la Tph2 se expresa de manera predominante en el sistema nervioso central y las neuronas entéricas del intestino, mientras que la Tph1 se expresa de manera periférica en el organismo (Patel *et al.*, 2004). La PCPA es capaz de inhibir la síntesis de ambas isoformas de Tph, aunque algunos trabajos han visto que las afecta con diferente sensibilidad, siendo la Tph2 más sensible al efecto de PCPA (Barchas & Usdin, 1973; Koe & Weissman, 1966). Tanto con 5,7-DHT como con PCPA, se obtiene una reducción importante en los niveles de serotonina, que permite realizar estudios de función de este neurotransmisor. Es apropiado destacar que los efectos de estas sustancias no son del todo específicos, dado que la 5,7-DHT produce muerte celular y trae como consecuencia gliosis reactiva (Brezun & Daszuta, 2000b), lo que puede generar efectos indeseados no relacionados a la falta de serotonina. La selectividad de la 5,7-DHT para inducir la degeneración de las terminales nerviosas serotoninérgicas en modelos animales puede mejorar si se administra previamente un inhibidor selectivo de la recaptación de noradrenalina como la nomifensina (Compan *et al.*, 1998). Esto evita que este transportador capte la toxina y esta sea acumulada en las terminales noradrenérgicas. Por otro lado, los primeros trabajos que caracterizaron los efectos de la 5,7-DHT en ratas, demostraron que luego de una depleción inducida por la administración de esta toxina en el estriado, los niveles basales de serotonina medidos en esa zona cuatro semanas más tarde recuperaban valores normales (Kirby *et al.*, 1995). En el mismo trabajo, muestran, sin embargo, que la respuesta a un ISRS estaba atenuada. En suma, los autores sugieren que, tras la destrucción de neuronas serotoninérgicas causada por administración de esta neurotoxina, los mecanismos compensatorios permitían mantener los niveles de serotonina basales a través de las terminales serotoninérgicas que sobrevivían, pero que estos mecanismos no eran suficientes para que el sistema dañado respondiera a un desafío farmacológico (Kirby *et al.*, 1995).

Los primeros trabajos que emplearon modelos

farmacológicos de depleción de serotonina utilizaron ratas adultas de dos meses de edad y observaron que tanto con 5,7-DHT como con PCPA, ocurría una disminución en la proliferación determinada por células BrdU<sup>+</sup>, así como también de neuronas inmaduras marcadas con PSA-NCAM (Brezun & Daszuta, 1999, 2000a, 2000b). En sintonía con los resultados ya mencionados (Kirby *et al.*, 1995), Brezun & Daszuta (2000b) también pudieron observar que a los 60 días luego de la inyección de 5,7-DHT las fibras serotoninérgicas vuelven al estado fisiológico, y lo mismo ocurre con los niveles de células BrdU<sup>+</sup> y PSA-NCAM<sup>+</sup>. La suma de estos reportes indica que los cambios inducidos por la neurotoxina 5,7-DHT son reversibles en el mediano plazo. Siguiendo con los efectos sobre la neurogénesis, resultados posteriores reportaron también una disminución tanto en la proliferación medida a través de células BrdU<sup>+</sup> como en la sobrevivencia neuronal determinado por Dcx y PSA-NCAM, en ratas tratadas con PCPA entre 2 y 4 días (Jha *et al.*, 2006)(Benninghoff *et al.*, 2010)(Banasr *et al.*, 2001). Asimismo, se indicó una disminución en la proliferación celular en ratas lesionadas con la neurotoxina 5,7-DHT (Ueda *et al.*, 2005). Otro trabajo contemporáneo, constató una disminución del número de células Ki67<sup>+</sup> luego de un tratamiento de 3 días con PCPA, cambio que no se observó al prolongar el tratamiento por 14 días (Huang & Herbert, 2005). En ese mismo artículo, no se registraron alteraciones en la cantidad de neuronas marcadas con BrdU y Ki67 luego de un tratamiento con 5,7-DHT (Huang & Herbert, 2005). En contraposición con los resultados de los estudios descriptos hasta aquí, una tendencia ( $p=0.062$ ) hacia el aumento de células Dcx<sup>+</sup> fue descripta en el GD de ratas tratadas con 5,7-DHT (Jha *et al.*, 2006). En este sentido, un trabajo más reciente estudió el efecto de la depleción serotoninérgica, utilizando tratamientos crónicos con PCPA de 5 a 8 semanas (Diaz *et al.*, 2013). Si bien, no se observaron cambios en la proliferación (células BrdU<sup>+</sup>) se encontró sorprendentemente, un aumento significativo en la sobrevivencia neuronal (células BrdU<sup>+</sup> de 4 semanas de vida). Lo resumido hasta aquí genera contradicción, en el sentido de que un mismo tratamiento de depleción parece inducir tanto disminución como aumento del proceso de neurogénesis, en particular de la sobrevivencia. En el primer caso, la disminución de la sobrevivencia se reportó luego de tratamientos agudos

a subcrónicos de PCPA, mientras que el aumento de esta etapa del proceso neurogénico se evidenció luego de tratamientos crónicos con PCPA. No obstante, dado las desventajas mencionadas para los modelos farmacológicos, los animales transgénicos comenzaron a vislumbrarse como herramientas que permitirían estudiar los efectos de la depleción de serotonina de una manera más específica, complementando los estudios ya realizados.

### **Modelos transgénicos**

El desarrollo de la tecnología aplicada a la creación de ratones transgénicos permitió un estudio más exhaustivo de la relación entre la neurogénesis hipocampal adulta y el sistema serotoninérgico. Con los años se ha ido avanzando desde la eliminación de un gen de manera general durante toda la vida del organismo, pasando por deleciones específicas en ciertas regiones del sistema nervioso central o tipos de células, hasta ratones condicionales donde la expresión de un gen puede ser “prendida o apagada” en el momento de interés. Por lo tanto se puede hablar, por un lado, de modelos animales transgénicos constitutivos, donde la depleción de los niveles de serotonina ocurre durante toda la vida, pudiendo ocasionar efectos indeseables o inespecíficos debido a la importancia de este neurotransmisor en el desarrollo. La gran mayoría de estos modelos animales tiene como fondo genético la cepa endocriada C57BL/6. Por otro lado, están los modelos transgénicos condicionales, donde el “apagado” de un gen y por ende, la depleción de serotonina, se logra a partir de la inoculación en los animales de un agente, permitiendo el estudio de sus efectos a una edad específica. Un ejemplo son los ratones donde el “apagado” del gen se realiza mediante inyección de la toxina de la difteria. Estos ratones poseen el receptor para esta toxina (*Diphtheria Toxin Receptor* -DTR-) inserto en el *locus* de ROSA26, un *locus* usado generalmente para activar la expresión de genes a través de su promotor. La expresión generalizada del receptor de la toxina es bloqueada por una secuencia STOP flanqueada por loxP río arriba. Al cruzar ese ratón con otro que expresa la enzima recombinasa Cre, la secuencia STOP es eliminada de aquellos tejidos donde Cre está presente, permitiendo la expresión del receptor de la toxina de la difteria. En consecuencia, estas células son susceptibles de sufrir una ablación luego de la administración de la toxina (Buch *et*

*al.*, 2005). Bajo este mecanismo es posible, por ejemplo, eliminar las neuronas serotoninérgicas específicamente, si se utiliza un ratón que exprese la recombinasa Cre unida a algún gen que solo se encuentre expresado en un tipo de células de interés. Esta eliminación se daría solamente luego de la inoculación de la toxina.

### **Modelos constitutivos**

En los primeros animales transgénicos hiposerotonérgicos que fueron desarrollados fue eliminado el gen del transportador de serotonina (SERT o 5-HTT). Si bien en estos ratones se constata un aumento en las concentraciones de serotonina en el espacio extracelular, los niveles totales en los tejidos cerebrales se encuentran significativamente disminuidos. Por este motivo es que se los considera como hiposerotonérgicos (Karabeg *et al.*, 2013). En el primer estudio publicado con este modelo se encontró que no había cambios en la proliferación ni en la supervivencia neuronal en el GD de ratones de 7 semanas o de 3 meses de vida comparados con sus controles (Schmitt *et al.*, 2007). En cambio, en ratones envejecidos de 14 meses de vida se observó un aumento en la proliferación (células BrdU<sup>+</sup>), aunque no en la supervivencia (también medida con BrdU). Un trabajo posterior reportó un aumento en ambas etapas del proceso neurogénico, revelado por un mayor número de células Ki67<sup>+</sup> y NeuroD<sup>+</sup> (Karabeg *et al.*, 2013). Por otro lado, en un estudio realizado con ratas transgénicas de dos meses de vida se observó un aumento en la supervivencia neuronal, determinada a través de Dcx (Schipper *et al.*, 2011). Si bien estos resultados parecen paradójicos, dado que se oponen a lo observado en la mayoría de los modelos farmacológicos y a la hipótesis que se tenía hasta ese momento, fueron luego fuertemente confirmados por diversos estudios. Un primer trabajo analiza la neurogénesis en dos modelos de ratones transgénicos de 7 semanas de vida: en el primero se elimina un factor de transcripción necesario para la formación de las neuronas serotoninérgicas del rafe, llamado Pet1 (ratones Pet1<sup>-/-</sup>); el segundo es un modelo más elegante, en el que se elimina el transportador encargado de ingresar la 5-HT en el interior de las vesículas, VMAT2, específicamente de las células que expresan el SERT (ratones SERT<sup>Cre/+</sup>;VMAT2<sup>fl/fl</sup>). Esta eliminación puntual imposibilita que el neurotransmisor sea acumulado en las vesículas presinápticas, limitando la liberación de serotonina a la sinapsis. En ambos modelos



hiposerotonérgicos, se observó ausencia de cambios en la proliferación celular, medida como células BrdU<sup>+</sup> de un día de vida, pero se puso en evidencia un aumento significativo en la sobrevivencia neuronal a través de células BrdU<sup>+</sup> de 4 semanas de vida (Diaz *et al.*, 2013). Otro modelo donde las neuronas serotonérgicas no se desarrollan es aquel donde se elimina específicamente de estas neuronas un factor de transcripción llamado Lmx1b que, al igual que Pet1, es necesario para la diferenciación de las neuronas serotonérgicas (Pet1<sup>Cre</sup>;Lmx1b<sup>ff</sup>). Un trabajo menciona que la neurogénesis hipocámpal adulta en estos animales no está alterada, refiriéndose, aparentemente, a la etapa de proliferación de neuroprogenitores (Jia *et al.*, 2014).

Por otro lado, un modelo muy utilizado hasta el momento es aquel donde se altera el gen de la enzima Tph2, ya sea de forma generalizada como de forma específica en las neuronas del rafe, reduciéndose significativamente la síntesis de serotonina. En trabajos realizados con ratones Tph2<sup>-/-</sup> no se observaron cambios en la proliferación neuronal en el GD (Klempin *et al.*, 2013). Sin embargo, en otro estudio se utilizó un modelo donde se sobreexpresa una forma mutada del gen Tph2, lo que genera una disminución del 60-80% de los niveles de serotonina (Sachs *et al.*, 2013). Nuevamente, no se reportaron cambios en los niveles de proliferación (células BrdU<sup>+</sup>), pero los autores observaron una mayor sobrevivencia neuronal, determinada por los marcadores BrdU y Dcx. Esta observación se complementó con una disminución en la apoptosis, medida a través de la expresión de caspasa 3 (Sachs *et al.*, 2013). Por último, un modelo de delección de la enzima Tph2 específicamente en neuronas serotonérgicas (Pet1<sup>Cre</sup>;Tph2<sup>ff</sup>) mostró un aumento significativo en el número de células Dcx<sup>+</sup> (Song *et al.*, 2017). En suma, pareciera que los modelos de disminución de los niveles de serotonina a consecuencia de una menor actividad de su síntesis, generan un aumento significativo de la sobrevivencia de las nuevas neuronas nacidas en el GD adulto, sin repercusiones a nivel de la proliferación neuronal.

### **Modelos inducibles**

Como se explicó anteriormente, los modelos transgénicos inducibles poseen la ventaja de permitir la eliminación del gen de interés en el momento de la vida del animal que se requiera, mediante la inyección de, por ejemplo, una toxina. El primer estudio con ratones hiposerotonérgicos

inducibles utilizó ratones Pet1-Cre;Rosa26-DTR, en los que la administración de la toxina de la difteria elimina las neuronas serotonérgicas del rafe, dado que el receptor de la toxina se expresa junto al factor de transcripción previamente mencionado Pet1 (Jia *et al.*, 2014). Ratones adultos (de más de 3 meses de edad) fueron inyectados con la toxina y luego de 4 semanas se realizaron las determinaciones mediante la técnica de inmunohistoquímica. Estos ratones presentan un aumento tanto en la proliferación (células BrdU<sup>+</sup>) como en el número de neuronas inmaduras (células NeuroD<sup>+</sup> y POMC<sup>+</sup>) (Jia *et al.*, 2014). Otro trabajo más reciente con este mismo modelo y mismo tratamiento también observó un aumento de la sobrevivencia neuronal (células Dcx<sup>+</sup> y POMC<sup>+</sup>) (Song *et al.*, 2017). Existe también un modelo que utiliza tamoxifeno en vez de la toxina de la difteria como inductor (Pet1-CreER<sup>T2</sup>; Rosa26-DTA). Ratones que recibieron tamoxifeno a los 2,5-3 meses de vida y estuvieron en condiciones de hiposerotonergia por un mes, mostraron un aumento en la proliferación celular (células BrdU<sup>+</sup>, MCM2<sup>+</sup> y Ki67<sup>+</sup>) y en la sobrevivencia neuronal (células Dcx<sup>+</sup>, BrdU<sup>+</sup> y NeuroD<sup>+</sup>) (Song *et al.*, 2016). A su vez, estos autores utilizaron otros ratones en los cuales se inactivó la enzima que sintetiza serotonina en las neuronas serotonérgicas mediante la inoculación de tamoxifeno (Pet1-CreER<sup>T2</sup>; Tph2<sup>fllox/fllox</sup>) a los 1,5 meses de vida. En este caso también reportaron un aumento en los diferentes procesos neurogénicos (células BrdU<sup>+</sup>, NeuroD<sup>+</sup> y Dcx<sup>+</sup>) (Song *et al.*, 2016).

### **Otros modelos animales con déficits de serotonina**

Un modelo que se ha utilizado con el fin de generar una reducción en los niveles de serotonina consiste en la administración de una dieta carente del aminoácido triptófano, a partir del cual se sintetiza el neurotransmisor serotonina. Este aminoácido solo puede ser obtenido mediante la ingesta y una privación en la alimentación lleva a una incapacidad de sintetizar serotonina, con una consecuente disminución en sus niveles tisulares. En ratas adultas sometidas a una dieta carente de este aminoácido por 4 semanas en edad posnatal, se encontró una disminución significativa de la proliferación celular en el GD, determinado con células marcadas con BrdU (Zhang *et al.*, 2006).

Hasta donde sabemos, no hay reportados en la bibliografía otros modelos de hiposerotonergia como tal. No obstante, se

han publicado trabajos dedicados al estudio de patologías como la enfermedad de Parkinson u otras que afectan el sistema nervioso, que emplean modelos animales en los cuales se ha descrito una disminución de los niveles centrales de serotonina. Asimismo, en esos modelos, se ha estudiado la sobrevida de las nuevas neuronas nacidas en el hipocampo, por lo que resulta interesante mencionarlos en esta revisión para complementar los resultados hasta aquí descritos en los modelos de hiposerotonergia.

Un primer modelo que mencionamos se ha desarrollado para estudiar la enfermedad de Parkinson y consiste en la depleción dopaminérgica por administración sistémica de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). Estudios hechos en ratones C57BL/6 muestran que la administración intraperitoneal de MPTP en protocolos agudos (1 día) o subagudos (5 días), lleva a una disminución significativa en los niveles de serotonina de entre 35 y 50% en el cerebro medio y de 40 a 70% en el hipocampo (Pain *et al.*, 2013). Un tratamiento de 3 días de MPTP en ratones también indujo cambios a nivel de neurogénesis, determinados por inmunohistoquímica tanto a los 10 días postratamiento como a los 28 días. En ambos casos, se observó un aumento en la proliferación (células BrdU<sup>+</sup>/Nestina<sup>+</sup>) y un aumento en la sobrevida temprana, medida como células Nestina<sup>+</sup>/Dcx<sup>+</sup> (Lesemann *et al.*, 2012). Otro modelo de la enfermedad de Parkinson, en este caso, genéticamente modificado, consiste en ratas en las cuales se inserta una construcción que permite la sobre-expresión de una proteína, la alfa sinucleína, cuya acumulación en distintas regiones del cerebro ocurre característicamente en esta patología degenerativa (Nuber *et al.*, 2013). En este modelo se constató una reducción de alrededor del 80% de los niveles de serotonina en el hipocampo de las ratas transgénicas, concomitante con una disminución de la sobrevida de las nuevas neuronas, pero sin afectarse la proliferación en el GD (Kohl *et al.*, 2016).

Un último modelo animal, en este caso propuesto para estudiar ciertos síntomas de la esquizofrenia, consiste en ratones en los cuales se elimina el gen de una proteína asociada a microtúbulos denominada STOP (por su sigla en inglés, *stable tubule only polypeptide*). En estos ratones se registra una disminución significativa de los niveles de serotonina en regiones de proyección como el hipocampo (46%) y la corteza frontal (35%), pero sin

cambios significativos en el cerebro medio (Fournet *et al.*, 2010). En este caso, los animales transgénicos con déficits serotoninérgicos en áreas del sistema nervioso, mostraron una disminución en la tasa de proliferación y sobrevida de las nuevas neuronas en el GD.

### Conclusiones generales

Los distintos resultados obtenidos con los diversos modelos son llamativos, dado que parecen contraponerse entre farmacológicos y transgénicos. Sin embargo, un análisis en detalle de los resultados, permite comprender que la paradoja no es tal. Analizando por ejemplo los estudios hechos con el tratamiento de PCPA, los resultados opuestos podrían deberse a diferencias en los protocolos de administración, dado que tanto las dosis como los días de tratamiento varían de un estudio a otro. Todos aquellos estudios donde se observó una disminución en la neurogénesis utilizaron protocolos semiagudos, de dos a cuatro días de inoculación, mientras que aquel que demostró un aumento en la sobrevida neuronal lo hizo luego de un tratamiento crónico de cinco a ocho semanas. Además, en uno de los trabajos se observó una disminución en la proliferación luego de un tratamiento agudo pero no con uno crónico (Huang & Herbert, 2005). Estos resultados en conjunto nos permiten proponer la hipótesis de que el efecto de PCPA es modulado a través el tiempo, con una inicial disminución de la neurogénesis, que pasaría a una etapa de compensación y adaptación fisiológica donde la neurogénesis aumentaría si la depleción en los niveles de serotonina continúa. Esta conclusión también encuentra sustento en los resultados obtenidos en animales inyectados con 5,7-DHT, en los que se vio una recuperación neuroquímica y plástica luego de 1 y 2 meses, respectivamente, de la inoculación de la neurotoxina (Brezun & Daszuta, 2000b; Kirby *et al.*, 1995). Para el caso de los modelos animales transgénicos, los resultados son más consistentes, habiéndose reportado mayormente aumentos de la sobrevida neuronal en el hipocampo adulto de ratones con bajos niveles de serotonina tanto constitutivos (a lo largo de toda la vida) como en el caso de los modelos inducibles. Por otro lado, es notorio que, prácticamente, en todos los estudios que emplearon ratas, se observó una disminución de la sobrevida de las nuevas neuronas a consecuencia de un déficit de serotonina, logrado con distintos modelos. Por el contrario, ante la misma situación pero en modelos

de ratones, la sobrevivencia de las nuevas neuronas se vio incrementada sin observarse efecto sobre la proliferación de las neuronas del GD. Esta observación es muy consistente y debería tenerse en cuenta al elegir el modelo, ya que las respuestas en estas dos especies murinas son claramente dicotómicas. Asimismo, considerando que el objetivo principal de las investigaciones biomédicas es la extrapolación de estos resultados para tratar patologías en humanos, es importante remarcar las diferencias notorias detectadas en estudios llevados a cabo en dos especies tan cercanas como lo son las ratas y los ratones. Estas diferencias demandan mucha más cautela al pensar en la traslación de estos datos experimentales ya que, al día de hoy, no hay información específica que demuestre cómo se modula el proceso de neurogénesis adulta en el hipocampo humano ante diferentes configuraciones del sistema serotoninérgico. De manera interesante, se ha planteado recientemente cierta controversia en cuanto a la presencia de niveles significativos de neurogénesis adulta en el hipocampo de los seres humanos. Uno de los mayores problemas detrás de esta controversia es la dificultad de realizar estudios en nuestra especie tal como se realizan en modelos animales. En el caso de los humanos, se suele recurrir a tejidos *post mortem* en diversos estados de preservación que, en ciertos casos, dificultan la realización de los estudios histológicos o la comparación de los resultados. Además, no es posible aplicar en los humanos el método “*gold standard*” de la neurogénesis, es decir la incorporación de BrdU administrado por vía exógena. Aun así, distintos laboratorios han intentado sobreponerse a estos problemas con estrategias diferentes, como lo es el análisis de las concentraciones de C14 en el hipocampo (Spalding *et al.*, 2013) o la utilización de un panel amplio de marcadores de progenitores neuronales o células inmaduras idénticos a los usados en roedores (Knoth *et al.*, 2010). De estos estudios se desprende una cantidad considerable de evidencia que soporta la presencia de neurogénesis en los humanos en niveles considerables. Si bien recientemente salió a la luz un trabajo donde se sugiere la ausencia de marcadores de neurogénesis en el hipocampo de personas de entre 7 y 77 años, la cual solo estaría presente en individuos menores a esa edad (Sorrells *et al.*, 2018), otro trabajo publicado casi en simultáneo sostiene que no solo hay presencia abundante de estos marcadores sino que

además, sus niveles de expresión no se ven muy afectados con el envejecimiento (Boldrini *et al.*, 2018). Sumando la evidencia disponible y considerando cuestiones técnicas como la utilización de métodos estereológicos para la cuantificación de células marcadas, parecería entonces que efectivamente la neurogénesis adulta también ocurre en el *Homo sapiens* (Kempermann *et al.*, 2018).

Volviendo a los resultados analizados de manera conjunta en modelos animales, la hipótesis de que una disminución en los niveles de serotonina disminuiría la neurogénesis en el GD no tiene sustento de acuerdo con lo demostrado hoy. En efecto, cuando esta disminución es crónica y sobre todo en ratones, se ve un aumento consistente en varias etapas del proceso neurogénico, en especial la sobrevivencia neuronal. Parecería ser, entonces, que lo importante a la hora de regular este proceso es la homeostasis del neurotransmisor, y que una alteración en sus niveles trae como consecuencia cambios en la plasticidad neuronal y adaptaciones neuroquímicas y fisiológicas que establecen un nuevo equilibrio en las redes neuronales del hipocampo.

### Referencias bibliográficas

- Altman, J., & Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *The Journal of Comparative Neurology*, 124(3), 319–335.
- Banasr, M., Hery, M., Brezun, J. M., & Daszuta, A. (2001). Serotonin mediates oestrogen stimulation of cell proliferation in the adult dentate gyrus. *European Journal of Neuroscience*, 14(9), 1417–1424.
- Barchas, J., & Usdin, E. (1973). *Serotonin and Behavior*. Academic Press.
- Baumgarten, H. G., & Lachenmayer, L. (1972). 5,7-Dihydroxytryptamine: Improvement in chemical lesioning of indoleamine neurons in the mammalian brain. *Zeitschrift Fr Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie*, 135(3), 399–414.
- Benninghoff, J., Gritti, A., Rizzi, M., LaMorte, G., Schloesser, R. J., Schmitt, A., Vescovi, A. L. (2010). Serotonin Depletion Hampers Survival and Proliferation in Neurospheres Derived from Adult Neural Stem Cells. *Neuropsychopharmacology*, 35(4), 893–903.

- Boda, E., Nato, G., & Buffo, A. (2017). Emerging pharmacological approaches to promote neurogenesis from endogenous glial cells. *Biochemical Pharmacology*, *141*, 23–41.
- Boldrini, M., Fulmore, C. A., Tartt, A. N., Simeon, L. R., Pavlova, I., Poposka, V., John Mann, J. (2018). Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell Stem Cell*, *22*(4), 589–599.
- Boldrini, M., Underwood, M. D., Hen, R., Rosoklija, G. B., Dwork, A. J., John Mann, J., & Arango, V. (2009). Antidepressants increase neural progenitor cells in the human hippocampus. *Neuropsychopharmacology*, *34*(11), 2376–2389
- Brezun, J. M., & Daszuta, A. (1999). Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats. *Neuroscience*, *89*(4), 999–1002.
- Brezun, J. M., & Daszuta, A. (2000a). Serotonergic reinnervation reverses lesion-induced decreases in PSA-NCAM labeling and proliferation of hippocampal cells in adult rats. *Hippocampus*, *10*(1), 37–46.
- Brezun, J. M., & Daszuta, A. (2000b). Serotonin may stimulate granule cell proliferation in the adult hippocampus, as observed in rats grafted with foetal raphe neurons. *European Journal of Neuroscience*, *12*(1), 391–396.
- Buch, T., Heppner, F. L., Tertilt, C., Heinen, T. J. A. J., Kremer, M., Wunderlich, F. T., Waisman, A. (2005). A Cre-inducible diphtheria toxin receptor mediates cell lineage ablation after toxin administration. *Nature Methods*, *2*(6), 419–426.
- Compan, V., Segu, L., Buhot, M.-C., & Daszuta, A. (1998). Differential effects of serotonin (5-HT) lesions and synthesis blockade on neuropeptide-Y immunoreactivity and 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B/1D</sub> and 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptor binding sites in the rat cerebral cortex. *Brain Research*, *795*(1–2), 264–276.
- Dahlström, A., & Fuxe, K. (1964). Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*, *20*(7), 398–399.
- Diaz, S. L., Doly, S., Narboux-Nême, N., Fernández, S., Mazot, P., Banas, S. M., Maroteaux, L. (2012). 5-HT<sub>2B</sub> receptors are required for serotonin-selective antidepressant actions. *Molecular Psychiatry*, *17*(2), 154–163.
- Diaz, S. L., Narboux-Nême, N., Trowbridge, S., Scotto-Lomassese, S., Kleine Borgmann, F. B., Jessberger, S., Gaspar, P. (2013). Paradoxical increase in survival of newborn neurons in the dentate gyrus of mice with constitutive depletion of serotonin. *European Journal of Neuroscience*, *38*(5), 2650–2658.
- Encinas, J. M., Vaahtokari, A., & Enikolopov, G. (2006). Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(21), 8233–8238.
- Fournet, V., Jany, M., Fabre, V., Chali, F., Orsal, D., Schweitzer, A., Martres, M. P. (2010). The deletion of the microtubule-associated STOP protein affects the serotonergic mouse brain network. *Journal of Neurochemistry*, *115*(6), 1579–1594.
- Gould, E. (2007). How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nature Reviews Neuroscience*, *8*(6), 481.
- Gross, C. G. (2000). Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nature Reviews Neuroscience*, *1*(1), 67–73.
- Huang, G.-J., & Herbert, J. (2005). Serotonin Modulates the Suppressive Effects of Corticosterone on Proliferating Progenitor Cells in the Dentate Gyrus of the Hippocampus in the Adult Rat. *Neuropsychopharmacology*, *30*(2), 231–241.
- Jéquier, E., Lovenberg, W., & Sjoerdsma, A. (1967). Tryptophan Hydroxylase Inhibition: the Mechanism by Which p-Chlorophenylalanine Depletes Rat Brain Serotonin. *Molecular Pharmacology*, *3*(3), 274–278.
- Jha, S., Rajendran, R., Davda, J., & Vaidya, V. A. (2006). Selective serotonin depletion does not regulate hippocampal neurogenesis in the adult rat brain: Differential effects of p-chlorophenylalanine and 5,7-dihydroxytryptamine. *Brain Research*, *1075*(1), 48–59.



- Jia, Y.-F., Song, N.-N., Mao, R.-R., Li, J.-N., Zhang, Q., Huang, Y., Xu, L. (2014). Abnormal anxiety- and depression-like behaviors in mice lacking both central serotonergic neurons and pancreatic islet cells. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8, 325.
- Kaplan, M. S. (1981). Neurogenesis in the 3-month-old rat visual cortex. *The Journal of Comparative Neurology*, 195(2), 323–338.
- Kaplan, M. S. (1985). Formation and Turnover of Neurons in Young and Senescent Animals: An Electronmicroscopic and Morphometric Analysis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 457(1), 173–192.
- Kaplan, M. S., & Hinds, J. W. (1977). Neurogenesis in the Adult Rat : Electron Microscopic Analysis of Light Radioautographs. *Science*, 197(4308), 1092–1094.
- Karabeg, M. M., Grauthoff, S., Kollert, S. Y., Weidner, M., Heiming, R. S., Jansen, F., Lewejohann, L. (2013). 5-HTT Deficiency Affects Neuroplasticity and Increases Stress Sensitivity Resulting in Altered Spatial Learning Performance in the Morris Water Maze but Not in the Barnes Maze. *PLoS ONE*, 8(10), 1–19.
- Kempermann, G., Gage, F. H., Aigner, L., Song, H., Curtis, M. A., Thuret, S., Frisé N 19, J. (2018). Human Adult Neurogenesis: Evidence and Remaining Questions. *Cell Stem Cell*.
- Kempermann, G., Song, H., & Gage, F. H. (2015). Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(9), a018812.
- Kirby, L. G., Kreiss, D. S., Singh, A., & Lucki, I. (1995). Effect of destruction of serotonin neurons on basal and fenfluramine-induced serotonin release in striatum. *Synapse*, 20(2), 99–105.
- Klempin, F., Beis, D., Mosienko, V., Kempermann, G., Bader, M., & Alenina, N. (2013). Serotonin Is Required for Exercise-Induced Adult Hippocampal Neurogenesis. *Journal of Neuroscience*, 33(19), 8270–8275.
- Knoth, R., Singec, I., Ditter, M., Pantazis, G., Capetian, P., Meyer, R. P., Kempermann, G. (2010). Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years. *PLoS ONE*, 5(1), e8809.
- Koe, B.K., & Weissman, A. (1966). p-Chlorophenylalanine: A specific depletor of brain serotonin. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 154(3), 499–516.
- Kohl, Z., Ben Abdallah, N., Vogelgsang, J., Tischer, L., Deusser, J., Amato, D., Winkler, J. (2016). Severely impaired hippocampal neurogenesis associates with an early serotonergic deficit in a BAC  $\alpha$ -synuclein transgenic rat model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 85, 206–217.
- Lacar, B., Parylak, S. L., Vadodaria, K. C., Sarkar, A., & Gage, F. H. (2014). Increasing the resolution of the adult neurogenesis picture. *F1000Prime Reports*, 6.
- Lesemann, A., Reinel, C., Hühnchen, P., Pilhatsch, M., Hellweg, R., Klaisle, P., Steiner, B. (2012). MPTP-induced hippocampal effects on serotonin, dopamine, neurotrophins, adult neurogenesis and depression-like behavior are partially influenced by fluoxetine in adult mice. *Brain Research*, 1457, 51–69.
- Malberg, J. E., Eisch, A. J., Nestler, E. J., & Duman, R. S. (2000). Chronic Antidepressant Treatment Increases Neurogenesis in Adult Rat Hippocampus. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(24), 9104–9110.
- Marín-Burgin, A., Mongiat, L., Pardi, M. B., & Schinder, A. (2012). Unique Processing During a Period of High Excitation/Inhibition Balance in Adult-Born Neurons. *Science*, 335(6073), 1238–1242.
- Mendez-David, I., David, D. J., Darcet, F., Wu, M. V., Kerdine-Römer, S., Gardier, A. M., & Hen, R. (2014). Rapid Anxiolytic Effects of a 5-HT<sub>4</sub> Receptor Agonist Are Mediated by a Neurogenesis-Independent Mechanism. *Neuropsychopharmacology*, 39(6), 1366–1378.
- Nuber, S., Harmuth, F., Kohl, Z., Adame, A., Trejo, M., Schönig, K., Riess, O. (2013). A progressive dopaminergic phenotype associated with neurotoxic conversion of  $\alpha$ -synuclein in BAC-transgenic rats. *Brain*, 136(2), 412–432.
- Pain, S., Gochard, A., Bodard, S., Gulhan, Z., Prunier-



- Aesch, C., & Chalon, S. (2013). Toxicity of MPTP on neurotransmission in three mouse models of Parkinson's disease. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 65(5), 689–694.
- Patel, P. D., Pontrello, C., & Burke, S. (2004). Robust and tissue-specific expression of TPH2 versus TPH1 in rat raphe and pineal gland. *Biological Psychiatry*, 55(4), 428–433.
  - Ramon y Cajal, S. (1928). *Degeneration and regeneration of the nervous system*. Oxford, England: Clarendon Press. Retrieved from <http://psycnet.apa.org/record/1928-10334-000>
  - Rapport, M. M. (1949). Serum vasoconstrictor (serotonin) the presence of creatinine in the complex; a proposed structure of the vasoconstrictor principle. *The Journal of Biological Chemistry*, 180(3), 961–969.
  - Sachs, B. D., Jacobsen, J. P. R., Thomas, T. L., Siesser, W. B., Roberts, W. L., & Caron, M. G. (2013). The effects of congenital brain serotonin deficiency on responses to chronic fluoxetine. *Translational Psychiatry*, 3(8), e291.
  - Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Hen, R. (2003). Requirement of Hippocampal Neurogenesis for the Behavioral Effects of Antidepressants. *Science*, 301(5634), 805–809.
  - Schipper, P., Kiliaan, A. J., & Homberg, J. R. (2011). A mixed polyunsaturated fatty acid diet normalizes hippocampal neurogenesis and reduces anxiety in serotonin transporter knockout rats. *Behavioural Pharmacology*, 22(4), 324–334.
  - Schmitt, A., Benninghoff, J., Moessner, R., Rizzi, M., Paizanis, E., Doenitz, C., Lesch, K. P. (2007). Adult neurogenesis in serotonin transporter deficient mice. *Journal of Neural Transmission*, 114(9), 1107–1119.
  - Song, N.-N., Jia, Y.-F., Zhang, L., Zhang, Q., Huang, Y., Liu, X.-Z., Ding, Y.-Q. (2016). Reducing central serotonin in adulthood promotes hippocampal neurogenesis. *Scientific Reports*, 6, 20338.
  - Song, N. N., Zhang, Q., Huang, Y., Chen, L., Ding, Y. Q., & Zhang, L. (2017). Enhanced dendritic morphogenesis of adult hippocampal newborn neurons in central 5-HT-deficient mice. *Stem Cell Research*, 19, 6–11.
  - Sorrells, S. F., Paredes, M. F., Cebrian-Silla, A., Sandoval, K., Qi, D., Kelley, K. W., Alvarez-Buylla, A. (2018). Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature*, 555(7696), 377.
  - Spalding, K. L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H. B., Frisén, J. (2013). Dynamics of Hippocampal Neurogenesis in Adult Humans. *Cell*, 153(6), 1219–1227.
  - Ueda, S., Sakakibara, S., & Yoshimoto, K. (2005). Effect of long-lasting serotonin depletion on environmental enrichment-induced neurogenesis in adult rat hippocampus and spatial learning. *Neuroscience*, 135(2), 395–402.
  - Wojtowicz, J. M., & Kee, N. (2006). BrdU assay for neurogenesis in rodents. *Nature Protocols*, 1(3), 1399–1405.
  - Zhang, L., Guadarrama, L., Corona-Morales, A. a, Vega-Gonzalez, A., Rocha, L., & Escobar, A. (2006). Rats subjected to extended L-tryptophan restriction during early postnatal stage exhibit anxious-depressive features and structural changes. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 65(6), 562–570.