



TESIS DOCTORAL

# SEÑALIZACIÓN SEROTONINÉRGICA ASTROCITO-NEURONA Y SU DISFUNCIÓN EN EL TRASTORNO DEPRESIVO





FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia

**SEÑALIZACIÓN SEROTONINÉRGICA ASTROCITO-  
NEURONA Y SU DISFUNCIÓN EN EL TRASTORNO  
DEPRESIVO**

Tesis doctoral

Presentada por: **Candela González Arias**

Directora: **Gertrudis Perea Parrilla**

**Instituto Cajal, CSIC**

Madrid, 2024





**Dña. Gertrudis Perea Parrilla**, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto Cajal (CSIC), Avda. Doctor Arce 37, Madrid.


HACE CONSTAR:

Que **Dña. Candela González Arias** ha realizado bajo mi dirección los trabajos de investigación correspondientes a la Tesis Doctoral titulada “*Señalización serotoninérgica astrocito-neurona y su disfunción en el Trastorno Depresivo*”.

La presente tesis doctoral ha sido realizada con financiación del Ministerio de Ciencia e Innovación y Universidades, con la obtención de la ayuda para contratos predoctorales para la formación de doctores 2017 (FPI2017; BES-2017-080303), asociada al proyecto BFU2016-75107-P. Además, se han utilizado fondos de los proyectos PID2019-106579RB-I00 y PID2022-142617NBI00 financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación, “ERDF A way of making Europe” (PLEC2022-009385) y “NextGeneration EU/PRTR” (MCIN/AEI/10.13039/501100011033), y por La Marató TV3 Foundation (#225619).

Considero que dichos trabajos han sido ejecutados satisfactoriamente y, una vez revisados, manifiesto mi conformidad con la presentación de esta tesis para la evaluación previa por parte de la Comisión Académica de Doctorado de la Universidad Autónoma de Madrid.

Para que conste y surta los efectos oportunos, lo firmo en Madrid, a 6 de febrero de 2024.



Fdo. Dra. Gertrudis Perea





## DECLARACIÓN DE COMPROMISO ÉTICO Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS DOCTORAL

AUTOR/-A:

DIRECTOR/-A(S):

PROGRAMA DE DOCTORADO:

TÍTULO:

Hago entrega de la citada tesis doctoral en tiempo y forma de acuerdo a la normativa vigente de la Escuela de Doctorado de la Universidad Autónoma de Madrid.  
de : citación y normas de publicación.

### DECLARO

- Que el documento responde al *Código de Buenas Prácticas en la Investigación* de Universidad Autónoma de Madrid.

Asimismo, como autor de la citada tesis doctoral:

- Que es un trabajo original y sin plagios, donde se han seguido los estándares internacionales
- Que soy conocedor de que el incumplimiento de las declaraciones anteriores supone la anulación del título de Doctor/-a

Del mismo modo, **ASUMO** frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse del incumplimiento del compromiso ético de la presente declaración.

Madrid, a



Fdo: D./D.ª \_\_\_\_\_

Actualizado: 28/09/2022





January 28, 2024

To Whom It May Concern,

I am pleased to offer my support for the international PhD thesis entitled "Señalización serotoninérgica astrocito-neurona y su disfunción en el trastorno depresivo" by Candela González Arias, which explores the complex interplay between astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signaling, serotonergic pathways, and depressive-like behaviours in animal models. Her research makes a significant contribution to the understanding of neurobiology and holds promise for the development of novel therapeutic interventions for depression. This research was carried out in the Neuro-Glial Networks Laboratory at the Cajal Institute (CSIC, Spain) under the supervision of Dr Gertrudis Perea.

Throughout her PhD thesis, Candela closely studied the role of astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics in the regulation of brain circuits, particularly in the context of chronic corticosterone exposure (Cort mice). Using a variety of experimental techniques, including ex vivo and in vivo  $\text{Ca}^{2+}$  imaging, optogenetic stimulation, and pharmacological manipulations, she investigated the mechanisms underlying serotonin-mediated modulation of astrocytic activity and its impact on synaptic plasticity.

The results of her study are both profound and revealing. Candela has shown that Cort mice have altered astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics in the medial prefrontal cortex (mPFC), which correlates with observed behavioral changes. In addition, her work revealed a reduction in serotonin mediated  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in mPFC astrocytes of Cort mice, accompanied by aberrant synaptic plasticity in layer 2/3 mPFC neurons. Most impressively, she showed that enhancing astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signaling using Gq-DREADDS effectively rescued mood, cognitive and social deficits in Cort mice, highlighting the therapeutic potential of targeting astrocytes in depressive-like states.

In addition to her groundbreaking research, Candela has demonstrated exceptional scientific productivity, presenting her work at numerous national and international symposia, and contributing to several peer-reviewed publications as both first author and co-author. Her internship at the Centre for Integrative Physiology and Molecular Medicine (CIPMM) in Germany under the supervision of Dr Frank Kirchhoff further enriched her scientific experience and solidified her expertise in the field.



In conclusion, Candela's thesis represents a tour de force in neuroscience research, characterized by rigorous methodology, innovative findings, and significant implications for clinical practice. Her academic achievements and scientific contributions undoubtedly place her among the brightest talents in the field.

For all the above reasons, I support the election of Candela González Arias to the International Doctorate.

Sincerely,

**Marco  
Fuenzalida**

Firmado digitalmente por  
Marco Fuenzalida  
Fecha: 2024.01.28 12:24:06  
-03'00'

**Marco Fuenzalida Núñez, PhD**  
Neural Plasticity Lab  
Center for Neurobiology and Integrative Physiopathology  
Director Institute of Physiology,  
Faculty of Science,  
Universidad de Valparaíso  
Chile.



*Department of Neuroscience*

*Alfonso Araque, PhD  
Professor  
Department of Neuroscience  
University of Minnesota  
3-160 Jackson Hall  
321 Church Street SE  
Minneapolis, MN 55455  
Tel: 612-624-0901  
E-mail: [araque@umn.edu](mailto:araque@umn.edu)*

January 15, 2024

## TO WHOM IT MAY CONCERN

This letter serves to support the international PhD Thesis entitled “Señalización serotoninérgica astrocito-neurona y su disfunción en el trastorno depresivo” authored by Candela González Arias, and performed at the Neuro-glial networks laboratory at the Cajal Institute (CSIC), under the supervision of Dr. Gertrudis Perea.

The work developed by Candela in her PhD thesis is focused on the role of astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in 5-HT evoked synaptic plasticity, and how this signaling impacts depressive-like states. This study is an excellent piece of work.

The thesis is well organized, the rationale of the experiments and the choice of the experimental strategies are presented in a clear and concise manner. Chapter 1 (Introducción) of the thesis provides a thorough description of neuron-astrocyte background, and state of the art techniques to study and to modulate  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in astrocytes, as well as a comprehensive description of the current knowledge regarding the relationship between astrocytes and major depressive disorder (MDD). Chapter 2 (Hipótesis y objetivos) clearly describes the aims of the thesis, which are basically focused on studying the properties of bidirectional communication between neurons and astrocytes in the medial prefrontal cortex (mPFC) and its relationship with the serotonergic system in physiological condition and in major depressive disorder (MDD). Chapter 3 (Materiales y métodos) describes material and methodologies. In this chapter the candidate has carried out extensive multi-disciplinary experiments involving imaging in freely moving animals, patch-clamp recordings in acute slices, optogenetic and chemogenetics designs combined with multiple behavioral tests. Chapter 4 (Resultados) provides evidence that chronic corticosterone treatment, as a model of MDD, showed an abnormal  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in mPFC astrocytes both spontaneously and related with social interactions. Moreover, this work showed that 5-HT-evoked mPFC synaptic plasticity engages astrocytic signaling, which is altered in depressive like-states. Finally, the candidate explored the consequences of using Gq-DREADDS in astrocytes to activate  $\text{Ca}^{2+}$  signaling. As a result, she found that the selective astrocyte activation in mPFC restores cognitive abilities in depressive like-states. In addition, she showed that in naïve mice this strategy promoted behavioral deficits. In chapter 5 (Discusión), the candidate discussed adequately her data in the context of current literature, showing a comprehensive understanding of the field.



Overall, the data shown in this PhD thesis are highly interesting and provocative, which have been published in a high impact journal.

In conclusion, this is a well-executed study that provide original and relevant findings in the field of neuron-astrocyte communication. I consider it as an excellent PhD thesis, and it is suitable in the current state for its defence.

Sincerely,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Alfonso Araque', with a stylized, sweeping flourish underneath.

Alfonso Araque  
Professor  
Department of Neuroscience  
University of Minnesota

"Perseguir las estrellas para no acabar  
como un pez en una pecera"

La elegancia del erizo

"En algún lugar, algo increíble  
está esperando ser conocido"

Carl Sagan





“Quiero perderme en un bosque dendrítico  
para reencontrarme conmigo misma,  
viajar mielinizada en cada impulso,  
experimentando un auge de positividad,  
sin perder ni un segundo la chispa,  
dejando huella en cada conexión  
aguardando ... el abrazo del astrocito”



# Agradecimientos

Para mí la tesis ha sido como habitar un realismo mágico, con días deslumbrantes salpicados por destellos de astrocitos, otros propios de un mundo kafkiano creando vínculos con neuronas y rezando por la salud de su membrana. En definitiva, el doctorado me ha hecho vibrar de curiosidad, salir de la matrioska, navegar en un cosmos sináptico y crear una bonita red de conexiones.

Ante la marea de emociones experimentadas quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas con las que he compartido este gran viaje.

Quiero comenzar con un agradecimiento especial a Gertrudis Perea por abrirme las puertas de su laboratorio y darme la oportunidad de hacer la tesis bajo su dirección. Por concederme a lo largo de estos años la posibilidad de asistir a numerosos congresos y de realizar colaboraciones que han enriquecido mi formación y mis conocimientos en Neurociencia. Por la confianza depositada en mí, por su generosidad y paciencia al encontrar siempre tiempo para guiarme y por ayudarme a conseguir metas, brindándome ánimos por el camino. Por su entusiasmo y cercanía al transmitirme su conocimiento, deslumbrándome con sus ideas y esa perspectiva original desde la que mira la ciencia. Por poder compartir su pasión por la ciencia en general y por los astrocitos en particular. Por celebrar cada pequeña alegría científica con saltos y aplausos. Por muchas anécdotas y momentos entrañables. Muchas gracias por todo, Gertru.

A Frank Kirchhoff por acogerme en su laboratorio durante la estancia, por hacerme sentir una más de su grupo, por su tiempo, su implicación y las ideas aportadas al proyecto y por añadir un toque de aventura al prestarme una de sus bicicletas para poder disfrutar más de Homburgo. Gracias también a todos los miembros de su laboratorio por la calidez con la que me trataron.

A Eduardo Martín y Marta Navarrete porque sus laboratorios han sido un lugar de ayuda ante nuevos retos, de suministros en caso de emergencia y una fuente de apoyo y ánimos. A Washington Buño por regalarnos frases como estas: “las preguntas bonitas, para las que tenemos respuesta son las que mostramos orgullosos, pero las que no entendemos las guardamos en un cajón” “lo que no se puede explicar es lo más interesante”.

A todas las personas del Laboratorio de Redes Neuro-gliales (A-17). A Mario Fernández de la Puebla por haber tenido la suerte de comenzar junto a ti en el laboratorio realizando el TFM, por transmitirme tu calma y por empezar a soñar juntos con los astrocitos. A Alicia Hernández por tu bondad y cariño, gracias por haberme hecho sentir tan a gusto cuando entré al laboratorio y por haberme dado ánimos durante todo este tiempo. A Sara Mederos por haber podido aprender de ti y por los buenos ratos compartidos en el laboratorio. A Jorge Ramírez por detenerte a enseñarme, por tus valiosos consejos y aportaciones al proyecto de la serotonina, acompañados de algún que otro verso. A Cristina Sánchez, maestra Jedi, por haber tenido la suerte de ser su Padawan en el laboratorio. Gracias por poner a punto el tratamiento de la corticosterona y por enseñarme a realizar las pruebas comportamentales con rigurosidad y positividad. Gracias por el apoyo que me brindaste, por muchos buenos momentos y por dejarnos envolver por los colores de Van Gogh. A Patricia Torres por poder compartir y disfrutar contigo de las ganas que ponías en cada experimento. A Julio Esparza por ser un compañero de laboratorio y amigo magnífico. Gracias por tu elocuencia, por tus buenas ideas, por traer al laboratorio muchas ganas, por cuestionarte cada pequeño detalle. Gracias por implementar tantos análisis computacionales, por tu paciencia al explicarme los scripts y por tu mirada crítica. Gracias porque a tu lado siempre daban ganas

de esforzarse más y más y por ser un grandísimo apoyo durante la tesis. A Andrea Sánchez por ser esa compañera de laboratorio y amiga que siempre querría en mi equipo. Por complementarnos a la perfección. Gracias por ofrecer siempre una mirada justa, sensata y honesta. Gracias por apoyarme y animarme en todo momento, por valorarme y buscar conmigo soluciones a cualquier problema como si trazáramos un plan para llegar a El Dorado. Gracias por tu grandísima ayuda cuando llegaron las revisiones del paper y por tu inspiradora tenacidad. Gracias por los muchos momentos de risas y aventuras compartidos en el laboratorio y fuera de él, y por darme calle. Gracias por haberte leído esta tesis y por tus valiosas apreciaciones. A Lucía Arancibia por traer tu luz, tu maravillosa risa y tu buen rollo al laboratorio. Con una persona así al lado cada reto se consigue, aunque de una operación con tres lupas simultáneas se trate. Gracias por tu bonita sensibilidad, por escucharme y por tu valiosa ayuda con los análisis. A Faezeh Ashouri, me siento muy afortunada de que llegaras al laboratorio, gracias por mostrarme otras realidades, por dar aún más valor a las palabras “Women, Life, Freedom”, por tu maravilloso sentido del humor, tu sensibilidad y esa manera que tienes de afrontar la vida. Gracias por escucharme, animarme y tener siempre abrazos y fruta preparados. A los tres inigualables ratones ciegos. A Samuel Alberquilla, qué suerte tenemos de que te incorporaras al laboratorio. Gracias por tu bondad, y generosidad, por fomentar el trabajo en equipo y por toda tu ayuda con los momentos finales de la tesis. A Jaime Esbrí, gracias por las reflexiones sobre la vida tan necesarias y por recordarme que puedo contar con tu ayuda. A Jorge Vindel, gracias por tu maravillosa manera de explicar las cosas y por tu fascinante personalidad. Gracias a los tres por vuestro gran apoyo y cariño en esta parte final de la tesis. A Francisca García, a María Priego, a Álvaro Bercedo, a Cristina Puigdueta y a Aroa Huguet por dejar bonitos recuerdos en vuestro paso por el laboratorio.

A Raquel Bajo, gracias porque cada día que aparecías por el laboratorio aprendía cosas nuevas contigo y por la alegría y el buen rollo que me transmites siempre.

A Andrea Navas, por nuestra gran conexión, por ser todo color, por darle alas a la acción poética, por despertar una creatividad dormida, por hacer que me enamorara rápidamente del jiu-jitsu y por elegirme como uke. Gracias por nuestros ratitos de audio/podcast y de Wingspan. Gracias por ser uno de los mayores apoyos durante la tesis y por aportarme tu sabia visión. A Sara Hernández por haber tenido la inmensa suerte de encontrarnos el primer día de carrera y por disfrutar de cerca desde entonces nuestros caminos. Gracias por tu amistad incondicional, por tu maravillosa espontaneidad, por nuestros momentos de té y por creer siempre que las cosas me iban a salir bien. Gracias también por haberte leído la tesis y por tus valiosos y bonitos comentarios. A Estrella Fernández de Sevilla por entendernos tan bien con una mirada. Por tu apoyo, tus consejos y ese café que por fin nos tomamos. A Irene Serra por haber tenido la suerte de compartir muchas aventuras y buenas conversaciones científicas y de la vida, por derrochar una pasión contagiosa por la Neurociencia, por la tenacidad que pones en todo lo que haces, me siento muy afortunada de tener tu amistad. Gracias también por el increíble viaje a Escocia compartido con nuestra querida Belén Zaroni. A Cristina Martín, gracias porque no hubo día que al vernos por los pasillos no me regalaras una gran sonrisa. A Laura Delgado y a Javier Sánchez por todos los ánimos que me habéis transmitido durante las comidas. A Juan Pablo Quintanilla, porque con pocas palabras te transmite su calma, por estar siempre dispuesto a ayudar y aportar conocimientos. Por ser mi gran compañero de viaje durante la aventura de la SfN de Washington, por tantas anécdotas, reflexiones, ilusiones e ideas compartidas. A Alberto Aguilera, gracias por transmitirme fuerza e ilusión y por tus múltiples consejos.

A todas las personas del Instituto Cajal, por ser como una gran familia científica y por la gran Ciencia que construís entre todos.

A Davide Gobbo por hacerme sentir como en casa durante la estancia. Por dedicar tiempo a ayudarme a poner a punto unos experimentos a priori fáciles, pero con los que tuvimos que ir sorteando numerosas dificultades metodológicas, por compartir la pasión por la ciencia, por deleitarme con tu maravillosa cocina italiana y por hacerme el mejor tiramisú de despedida. A Paula Gelonch y Nana Oye Awuku mis compañeras en el laboratorio de Frank Kirchhoff y las mejores amigas de residencia que pude imaginar. Compartir tiempo con vosotras fue sin duda de los mayores regalos de la estancia. Fuisteis para mis dos apoyos incondicionales. Gracias por emocionaros conmigo, por compartir la ilusión de investigar, por recorrer bosques nevados, por la cocina multicultural, por un tinte de pelo azul y por la cantidad de aventuras compartidas que me hacen sonreír solo con recordarlas.

A todos los que empezaron siendo compañeros del máster de Neurociencia y que se convirtieron rápidamente en amigos para toda la vida, qué suerte la de encontrarnos, la de decidir ser una piña desde el primer momento, aprender juntos y a pesar de ir tomando distintos caminos, conseguir que no falten nunca las casas neuro-rurales, los *escape room* y las neuro-quedadas varias. Qué orgullo estar rodeada de investigadores y personas tan brillantes como vosotros. A Santiago Guerra porque la explicación más sencilla de nuestras múltiples similitudes es que seamos hermanos separados al nacer, gracias por la conexión y la amistad tan bonita que tenemos. A Nira Hernández por ser para mí un referente de esfuerzo, dedicación y pasión por la Neurociencia y una amiga excepcional. A Elena Moreno por todas las tardes de teatros, circos y conversaciones llenas de cariño, nunca se me olvidará cuando me tenía que quedar hasta tarde en el laboratorio y apareciste con la cena diciendo: “¿tendrás que cenar en algún momento?, ¿no?”. A Miguel Fernández por estar siempre ahí, por darme siempre mucha paz y por endulzar los días que venías al laboratorio con comida rica. A Ana Cristina Ojalvo, gracias por estar siempre dispuesta a ayudarme y asesorarme con cualquier trámite burocrático del doctorado. A Ágata Silván por haber sido siempre una fuente inagotable de motivación. A Inés Abalo por tu manera inspiradora de ver la Ciencia. A Pablo Hernández por ser un *music man* y por transmitir tan bien el buen rollo que te caracteriza. A Rebeca Gavrila por ser una persona increíble, llena de pura bondad.

A Belén Zanoni, Katia Soud, Inés Hojas, Luciana López e Irene Serra por encontrarnos, crear un bonito vínculo y hacer que el curso de “Optogenética, quimiogenética y biosensores” en Burdeos fuera una aventura inolvidable.

A Chema Becedas porque siempre se puede contar contigo, por el dominio que haces de la dialéctica para sacarme la risa. Por haber sacado tiempo para leerte esta tesis y por tus acertados comentarios. A Alba Cáceres porque desde que nos conocimos me has aportado siempre una gran luz. A Samuel López, a Ana León, a Joaquín Sánchez y a Aníbal Gallardo por habernos encontrado durante el Congreso ENCODS y desde entonces compartir con vosotros los mejores momentos en cada nuevo congreso. A Álvaro Fernández y Mariam Al-Masmudi por haber disfrutado con los experimentos que realizamos juntos.

A mis amigos de la carrera y allegados, grandísimos compañeros de viajes, de momentos inolvidables, a los que quiero y admiro a partes iguales. A Esther Palacios, por tu inmenso cariño y por saber que nada acompaña mejor los ánimos increíbles que me diste en los momentos de mayor estrés que unas galletas de chocolate. A Javier Reyeros, la mejor liebre ante cualquier carrera, por compartir espíritu aventurero y porque como me dijiste una vez: no hay orbayu que nos pare. A Antonio Tapia, la dulzura en persona, gracias por escucharme y por tu inmensa generosidad, por estar siempre disponible para ayudar en lo que sea. A María Villa por compartir pasión por estudiar el cerebro, por esa buenísima combinación de inteligencia y sarcasmo tan divertida y maravillosa. A Marta Pérez por tu sensatez y por traer siempre las mejores historias de meros y morenas para que una tarde sea inolvidable. Gracias a

todos por animarme a lo largo de esta maratón, por los bonitos mensajes y el cariño durante las épocas más estresantes y por celebrar juntos todos los buenos momentos.

A Ana Belén Iyamu, gracias por sacar ratitos para sumergirnos en conversaciones profundas, por animarme a lo largo de toda la tesis y por proyectar juntas llenas de ilusión nuestros futuros.

A mi ya familia abulense por todo el cariño y los ánimos que me habéis transmitido durante todos estos años.

A mi familia peruana, porque a pesar de la distancia cada mensaje que me enviabais lo sentía como un gran abrazo.

A mi familia asturiana mi mayor tesoro dentro del paraíso natural. A mis Abuelos por creer siempre en mí, por inspirarme, motivarme y por quererme 10 de 10. A mis tíos por todo su cariño y a mis primos por escuchar intrigados los resultados de cada investigación.

Quiero expresar un grandísimo agradecimiento a mis padres por haberme dado todas las oportunidades para poder realizar un doctorado, alas para soñar, por hacer que vea arte en toda ciencia y por ser una fuente inagotable de inspiración. A mi padre por transmitirme tus férreos valores, por buscar siempre como inspirarme ya sea con la cita de un libro, un recorte de periódico o con una gran conversación. Por sumergirte de lleno en la Neurociencia para poder dibujar la portada de esta tesis. A mi madre por alentarme a ir a por todas, por tu mirada siempre amable, porque el esfuerzo y dedicación que pones en cada cosa que haces es mi mayor fuente de inspiración. Por darme las herramientas para modelar mi vida a mi gusto. Por entender tan bien los procesos que se recorren durante una tesis, endulzarme los días y llenarme de ilusión. A mi hermano por tu serenidad, por darme seguridad y por inundarlo todo con tu gran carisma. Por tu bonita ayuda con la maquetación de esta tesis. Eres todo un ejemplo para mí.

A Jorge Bravo por creer en mí, por estar siempre a mi lado apoyándome incondicionalmente, siendo ese faro que todo lo ilumina. Por tus abrazos que son casa, por el encanto natural con el que me impulsas a perseguir las estrellas, por tu gran generosidad y paciencia. Por brindarme alegría en días de tormenta y emocionarte conmigo tras cada pequeño logro. Por acompañar esta tesis con tanto amor. Gracias por hacerme tan feliz y sacar la mayor de mis sonrisas. Por seguir improvisando la vida juntos fiancé.

A mi Abuela Mari, siempre orgullosa de mí, por ser mi estrella favorita.



# Índice general

Agradecimientos .....	I
Índice general.....	VII
Índice de figuras .....	X
Acrónimos .....	XIII
Resumen .....	XVII
Abstract.....	XIX
I. Introducción .....	<b>3</b>
1. Papel de los astrocitos en la actividad cerebral.....	3
1.1. Excitabilidad de los astrocitos: señalización de $\text{Ca}^{2+}$ .....	5
1.1.1. Herramientas para estudiar la señalización de $\text{Ca}^{2+}$ en astrocitos.....	9
1.1.2. Herramientas para modular la señalización de $\text{Ca}^{2+}$ en astrocitos.....	11
1.2. Comunicación astrocito-neurona.....	15
1.2.1. Implicación del astrocito en la sinapsis.....	15
1.2.2. Implicación del astrocito en los circuitos cerebrales.....	18
1.2.3. Implicación del astrocito en el comportamiento animal.....	19
2. Sistema serotoninérgico.....	20
2.1. Núcleo dorsal del rafe .....	22
2.2. Neurotransmisión serotoninérgica en la CPFm .....	23
2.2.1. Astrocitos y señalización serotoninérgica.....	30
3. Trastorno depresivo (TD) .....	30
3.1. Modelos murinos para el estudio del TD .....	34
3.2. Disfunción del sistema serotoninérgico y el TD .....	35
3.3. Implicación de los astrocitos en el TD.....	37
II. Hipótesis y objetivos.....	<b>43</b>
III. Materiales y métodos.....	<b>47</b>
1. Declaración ética .....	47
2. Animales de experimentación animal.....	47
2.1. Modelo murino de TD .....	47
3. Cirugías .....	50
3.1. Infecciones virales .....	50
3.2. Implantación de fibra óptica .....	52
4. Obtención de rodajas de cerebro .....	53
5. Imagen de $\text{Ca}^{2+}$ .....	54
5.1. Registros <i>ex vivo</i> .....	54
5.2. Registros <i>in vivo</i> .....	55
6. Registros de la actividad serotoninérgica <i>in vivo</i> .....	56
7. Registros electrofisiológicos <i>ex vivo</i> .....	57
8. Técnicas inmunohistológicas.....	60
9. Paradigmas comportamentales .....	62

9.1. Campo abierto.....	62
9.2. Laberinto en cruz elevado.....	63
9.3. Localización de objetos .....	63
9.4. Reconocimiento de objeto novedoso .....	64
9.5. Reconocimiento social .....	64
9.6. Natación forzada .....	65
10. Análisis de datos .....	66
10.1. Análisis de señales de $Ca^{2+}$ <i>ex vivo</i> .....	66
10.2. Análisis de señales de $Ca^{2+}$ <i>in vivo</i> .....	66
10.3. Análisis de la señal de 5-HT <i>in vivo</i> .....	68
10.4. Análisis histológico y de colocalización .....	68
10.5. Reconstrucción morfológica de astrocitos.....	69
10.6. Procedimientos estadísticos.....	71
IV. Resultados .....	75
1. El TD induce cambios morfológicos en los astrocitos de CPFm .....	75
2. El TD altera la actividad de $Ca^{2+}$ en astrocitos de CPFm.....	76
3. Los astrocitos de CPFm son sensibles a la señalización por 5-HT .....	78
4. El tratamiento con Cort induce una reducción en la liberación de 5-HT.....	83
5. La señalización de $Ca^{2+}$ inducida por 5-HT en astrocitos está alterada en el TD .....	85
6. El TD altera las dinámicas de $Ca^{2+}$ en astrocitos durante el reconocimiento social .....	87
7. 5-HT estimula la gliotransmisión en astrocitos de capa 2/3 de CPFm .....	89
8. 5-HT induce plasticidad sináptica en CPFm.....	91
8.1. 5-HT deprime de forma transitoria la transmisión sináptica excitadora en neuronas de la capa 2/3 de CPFm.....	91
8.2. Los astrocitos participan en la plasticidad sináptica inducida por 5-HT .....	93
8.3. Caracterización de los receptores serotoninérgicos involucrados en la modulación sináptica inducida por 5-HT .....	96
8.4. Contribución del receptor 5-HT <sub>2A</sub> expresado en astrocitos en la plasticidad sináptica inducida por 5-HT .....	98
8.5. Estudio de los gliotransmisores involucrados en la plasticidad sináptica evocada por 5-HT .....	101
9. La plasticidad sináptica inducida por 5-HT está alterada en el TD .....	102
10. La activación selectiva de astrocitos con Gq-DREADDS revierte las alteraciones cognitivas presentes en el TD .....	103
10.1. La activación de Gq-DREADDS desencadena un aumento de las señales de $Ca^{2+}$ en ratones control y Cort.....	103
10.2. La activación de los astrocitos de CPFm en ratones Cort reduce los niveles de desesperanza y ansiedad a niveles control .....	104
10.3. La activación selectiva de astrocitos de CPFm potencia la memoria de trabajo en ratones Cort .....	105

10.4. La activación selectiva de astrocitos de CPFm restaura la interacción social en ratones Cort .....	106
10.5. La presencia de CNO <i>per se</i> no afecta a la locomoción, cognición y sociabilidad de los animales.....	107
10.6. La activación de astrocitos de CPFm restaura los déficits cognitivos y sociales del TD en hembras .....	108
10.7. La activación selectiva de astrocitos de CPFm estimula la gliotransmisión y la transmisión sináptica .....	110
10.8. La inhibición sistémica del receptor mGluR1 en ratones Cort impide la recuperación del fenotipo depresivo .....	112
10.9. En condiciones fisiológicas el aumento de la señalización de Ca <sup>2+</sup> en astrocitos de CPFm recrea las alteraciones asociadas al TD .....	113
V. Discusión.....	119
VI. Conclusiones .....	133
VI. Conclusions .....	135
Bibliografía .....	137
A. Publicaciones .....	163
A.1. Dysfunctional serotonergic neuron-astrocyte signaling in depressive-like states .....	163



# Índice de figuras

## I. Introducción

I1. Ilustraciones de la neuroglía .....	3
I2. Vías de señalización de $\text{Ca}^{2+}$ en astrocitos.....	7
I3. Estrategias de manipulación de la señalización de $\text{Ca}^{2+}$ en astrocitos.....	14
I4. Sinapsis tripartita .....	15
I5. Gliotransmisión .....	17
I6. Participación de los astrocitos en el comportamiento animal.....	20
I7. Vías de señalización de los distintos tipos de receptores para 5-HT .....	21
I8. Sistema serotoninérgico del cerebro de ratón.....	22
I9. Principales aferencias y eferencias del NDR.....	23
I10. Esquema de los circuitos excitatorios en la CPFm .....	25
I11. Esquema de los circuitos inhibitorios en la CPFm .....	27
I12. Localización de los receptores para 5-HT en CPFm .....	28
I13. Esquema de las principales hipótesis sobre la etiopatogénesis del TD .....	33

## III. Materiales y métodos

M1. Esquema del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA).....	48
M2. Evaluación del tratamiento con Cort en ratón.....	49
M3. Análisis de los niveles de Cort en suero y pelo .....	50
M4. Esquema de craneotomía e inyecciones virales .....	51
M5. Extracción y preparación de rodajas de cerebro .....	53
M6. Registro y análisis de la actividad de $\text{Ca}^{2+}$ en astrocitos <i>ex vivo</i> .....	55
M7. Sistema de fotometría de fibra óptica y registro de señales de $\text{Ca}^{2+}$ <i>in vivo</i> .....	56
M8. Esquema del sensor de 5-HT, iSeroSnFR.....	56
M9. Esquema de un equipo de electrofisiología para registros <i>ex vivo</i> .....	58
M10. Aproximación experimental para el registro electrofisiológico de neuronas piramidales de capa 2/3 de CPFm .....	59
M11. Espectro de excitación de diversas opsinas ligadas a canales catiónicos.....	59
M12. Cronograma de los paradigmas comportamentales realizados .....	62
M13. Representación del test de campo abierto.....	62
M14. Representación del laberinto en cruz elevado .....	63
M15. Test de localización de objetos .....	64
M16. Test de reconocimiento de objeto novedoso .....	64
M17. Test de reconocimiento social .....	65
M18. Representación del test de natación forzada .....	65
M19. Análisis de los eventos de $\text{Ca}^{2+}$ <i>ex vivo</i> .....	66
M20. Análisis de los eventos de $\text{Ca}^{2+}$ <i>in vivo</i> .....	67
M21. Representación de la reconstrucción y análisis morfológico de astrocitos.....	70

## IV. Resultados

R1. Aumento de la complejidad morfológica de astrocitos de CPFm en ratones Cort .....	76
---	----

R2. Alteración de las dinámicas de $\text{Ca}^{2+}$ poblacionales en ratones Cort durante la exploración de un campo abierto.....	77
R3. Alteración de las dinámicas de $\text{Ca}^{2+}$ a nivel de célula individual en ratones Cort .....	78
R4. Los astrocitos de CPFm responden con oscilaciones de $\text{Ca}^{2+}$ a la liberación endógena de 5-HT por parte de las proyecciones serotoninérgicas del NDR .....	79
R5. Expresión del receptor 5-HT <sub>2A</sub> en astrocitos de CPFm.....	80
R6. La activación de los receptores 5-HT <sub>2</sub> promueve la señalización de $\text{Ca}^{2+}$ en astrocitos.....	81
R7. El bloqueo selectivo de los receptores 5-HT <sub>2A</sub> reduce la señalización de $\text{Ca}^{2+}$ en astrocitos.....	82
R8. 5-HT estimula la activación de la vía IP3 en astrocitos de CPFm .....	83
R9. Los ratones Cort muestran niveles reducidos de 5-HT en CPFm tras la activación de las neuronas del NDR .....	84
R10. La señalización de $\text{Ca}^{2+}$ en astrocitos inducida por 5-HT está alterada en ratones Cort.....	85
R11. Los astrocitos de ratones Cort muestran una señalización de $\text{Ca}^{2+}$ aumentada en respuesta a ATP .....	86
R12. La señalización de $\text{Ca}^{2+}$ en astrocitos está alterada durante la interacción social en ratones Cort .....	88
R13. Aumento de la gliotransmisión espontánea y reducción de la evocada por 5-HT en ratones Cort .....	90
R14. La gliotransmisión evocada por 5-HT requiere la activación de receptores 5-HT <sub>2</sub> y NMDA ....	91
R15. Depresión sináptica transitoria de las EPSCs inducida por 5-HT en neuronas piramidales de capa 2/3 de CPFm .....	92
R16. Depresión transitoria de las EPSCs inducida por liberación endógena de 5-HT desde las fibras serotoninérgicas.....	93
R17. Bloqueo de la señalización de $\text{Ca}^{2+}$ en astrocitos con BAPTA intracelular.....	94
R18. La señalización de $\text{Ca}^{2+}$ en los astrocitos de CPFm contribuye a la plasticidad sináptica evocada por 5-HT .....	94
R19. Los receptores metabotrópicos postsinápticos no participan en la plasticidad sináptica inducida por 5-HT .....	95
R20. La plasticidad sináptica inducida por 5-HT requiere la activación de receptores 5-HT <sub>1A</sub> y 5-HT <sub>2</sub> .....	97
R21. Rescate específico del receptor 5-HT <sub>2A</sub> en astrocitos de CPFm en ratones <i>htr2a</i> <sup>-/-</sup> .....	99
R22. La activación de receptores 5-HT <sub>2A</sub> en astrocitos induce una potenciación de las EPSCs .....	100
R23. La potenciación de las EPSCs en CPFm por TCB-2 depende de la activación conjunta de astrocitos y neuronas.....	101
R24. Los receptores mGluR1 y NMDA contribuyen a la plasticidad sináptica evocada por 5-HT ...	102
R25. La plasticidad sináptica evocada por 5-HT está alterada en la CPFm de ratones Cort.....	103
R26. GFAP-Gq-DREADDS induce un aumento en la señalización de $\text{Ca}^{2+}$ en astrocitos de CPFm en ratones control y Cort.....	104
R27. La estimulación quimiogénica de astrocitos de CPFm revierte los niveles de desesperanza y ansiedad en ratones Cort.....	105



R28. La activación quimiogénica de astrocitos de CPFm mejora la memoria de trabajo en ratones Cort.....	106
R29. La activación quimiogénica de astrocitos de CPFm restaura los niveles de interacción social en ratones Cort.....	107
R30. CNO <i>per se</i> no induce cambios en las habilidades cognitivas y sociales de ratones control.	107
R31. La activación quimiogénica de astrocitos de CPFm no induce cambios en la locomoción.	108
R32. La activación de astrocitos de CPFm revierte los déficits cognitivos y sociales en ratones Cort hembra.....	109
R33. La activación quimiogénica de astrocitos de CPFm aumenta la gliotransmisión en ratones control y Cort.....	110
R34. La activación quimiogénica de astrocitos de CPFm potencia la transmisión sináptica excitadora en ratones control y Cort.....	111
R35. Mecanismo de acción propuesto tras la activación de Gq-DREADDS en astrocitos de CPFm .....	112
R36. El bloqueo del receptor mGluR1 empeora el rendimiento conductual en los ratones control .....	112
R37.El bloqueo del receptor mGluR1 previene las mejoras conductuales inducidas por la activación quimiogénica de astrocitos en ratones Cort.....	113
R38.La activación quimiogénica de astrocitos de CPFm en ratones control recapitula las alteraciones conductuales asociadas al TD .....	114
R39.El bloqueo del receptor mGluR1 no afecta a los déficits conductuales inducidos por la activación quimiogénica de astrocitos en ratones control .....	114

## V. Discusión

D1. Mecanismo de acción propuesto del efecto de la señalización serotoninérgica sobre la transmisión sináptica excitadora en CPFm.....	124
D2. Hipótesis de la relación entre la señalización de $Ca^{2+}$ astrocitario y el rendimiento cognitivo .....	128



## Acrónimos

<b>2P</b>	Del inglés <i>Two Photon</i>
<b>3P</b>	Del inglés <i>Three Photon</i>
<b>5-HT</b>	Serotonina/5-hidroxitriptamina
<b>AAV</b>	Del inglés <i>Adeno-associated Virus</i>
<b>ABL</b>	Amígdala basolateral
<b>AC</b>	Adenilato ciclasa
<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>ACTH</b>	Del inglés <i>Adrenocorticotropic Hormone</i>
<b>Ado</b>	Adenosina
<b>AIDA</b>	Ácido 1-aminoindan-1,5-dicarboxílico
<b>Amg</b>	Amígdala
<b>AmgC</b>	Amígdala central
<b>AMPA</b>	$\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
<b>AMPc</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>ARC</b>	Núcleo arcuato, del inglés <i>Arcuate nucleus</i>
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>AVP</b>	Arginina vasopresina
<b>BDNF</b>	Del inglés <i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
<b>BO</b>	Bulbo olfatorio
<b>BOLD</b>	Del inglés <i>Blood Oxygen-Level-Dependent</i>
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Ion calcio
<b>CaMKII</b>	Calcio calmodulina cinasa II
<b>CCA</b>	Corteza cingulada anterior
<b>CCK</b>	Colecistoquinina
<b>CH</b>	Corriente de <i>holding</i>
<b>ChR2</b>	Del inglés <i>Channelrhodopsin 2</i>
<b>CNO</b>	Clozapina-N-óxido
<b>Cort</b>	Corticosterona
<b>CPF</b>	Corteza prefrontal
<b>CPFc</b>	Corteza prefrontal contralateral
<b>CPFm</b>	Corteza prefrontal medial

<b>CRH</b>	Del inglés <i>Corticotropin Releasing Hormone</i>
<b>CT</b>	Células corticotalámicas
<b>CVD</b>	Complejo vagal dorsal
<b>DA</b>	Dopamina
<b>D-AP5</b>	Ácido D-(-)-2-amino-5-fosfonopentanoico
<b>DG</b>	Diacilglicerol
<b>DREADDS</b>	Del inglés <i>Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs</i>
<b>EAAT-1</b>	Del inglés <i>Excitatory Amino Acid Transporter</i>
<b>EAAT-2</b>	Del inglés <i>Excitatory Amino Acid Transporter 2</i>
<b>eCBs</b>	Endocannabinoides
<b>EPM</b>	Laberinto en cruz elevado, del inglés <i>Elevated Plus Maze</i>
<b>EPSC</b>	Del inglés <i>Excitatory Postsynaptic Current</i>
<b>FLIM</b>	Del inglés <i>Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy</i>
<b>FST</b>	Natación forzada, del inglés <i>Force Swimming Test</i>
<b>GABA</b>	Ácido gamma-aminobutírico
<b>GDPβS</b>	Guanosina 5'-[β-tio]difosfato
<b>GECIs</b>	Del inglés <i>Genetically Encoded Calcium Indicators</i>
<b>GFAP</b>	Proteína ácida fibrilar glial, del inglés <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
<b>GFP</b>	Del inglés <i>Green Fluorecent Protein</i>
<b>GIRK</b>	Del ingles <i>G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels</i>
<b>GLAST</b>	Del inglés <i>Glutamate-Aspartate Transporter</i>
<b>GLT-1</b>	Del inglés <i>Glutamate Transporter 1</i>
<b>GPCR</b>	Del inglés <i>G Protein-Coupled Receptors</i>
<b>GR</b>	Del inglés <i>Glucocorticoid Receptor</i>
<b>GRIN</b>	Del inglés <i>Gradient-Index lens</i>
<b>GTP</b>	Guanosina-5'-trifosfato
<b>HMF</b>	Haz medial frontal
<b>HPA</b>	Hipotálamo-pituitario-adrenal
<b>HPC</b>	Hipocampo
<b>HPCv</b>	Hipocampo ventral
<b>HTL</b>	Hipotálamo
<b>IL</b>	Corteza infralímbica
<b>IP3</b>	Inositol 1,4,5-trifosfato

<b>IP3Rs</b>	Receptores para IP3
<b>IP3R2</b>	Receptor para IP3 tipo 2
<b>IT</b>	Células intratelencefálicas
<b>LCA</b>	Líquido cefalorraquídeo artificial
<b>LHb</b>	Habénula lateral, del inglés <i>Lateral Habenula</i>
<b>M1</b>	Corteza motora primaria
<b>MAO</b>	Monoaminoxidasa
<b>MCU</b>	Del inglés <i>Mitochondrial Calcium Uniporter</i>
<b>mEPSCs</b>	Del inglés <i>miniature Excitatory Postsynaptic Currents</i>
<b>mGluR1</b>	Receptor metabotrópico de glutamato tipo 1
<b>MR</b>	Del inglés <i>Mineralocorticoid Receptors</i>
<b>MS</b>	Mesencéfalo
<b>NA</b>	Noradrenalina
<b>NAc</b>	Núcleo accumbens
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sodio
<b>NCLX</b>	Del inglés <i>sodium/lithium/calcium exchanger</i>
<b>NCX</b>	Del inglés <i>sodium calcium exchanger</i>
<b>NDR</b>	Núcleo dorsal del rafe
<b>NMR</b>	Núcleo medial del rafe
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>NOR</b>	Reconocimiento de objeto novedoso, del inglés <i>Novel Object Recognition</i>
<b>NPB</b>	Núcleo parabraquial
<b>NSQ</b>	Núcleo supraquiasmático
<b>NTR</b>	Núcleo talámico reticular
<b>OF</b>	Campo abierto, del inglés <i>Open field</i>
<b>OIP</b>	Localización de objetos, del inglés <i>Object in Place</i>
<b>P2X4</b>	Del inglés <i>Purinergic Receptor 4</i>
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>PK</b>	Del inglés <i>Protein kinase</i>
<b>PKA</b>	Del inglés <i>Protein kinase A</i>
<b>PKC</b>	Del inglés <i>Protein kinase C</i>
<b>PL</b>	Corteza prelímbica
<b>PLC</b>	Del inglés <i>Phospholipase C</i>

<b>PMCA</b>	Del inglés <i>Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase</i>
<b>PV+</b>	Célula parvalbúmina positiva
<b>PVN</b>	Núcleo paraventricular, del inglés <i>Paraventricular Nucleus</i>
<b>RDoC</b>	Del inglés <i>Research Domain Criteria</i>
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>ROI</b>	Del inglés <i>Region of Interest</i>
<b>RyR</b>	Del inglés <i>Ryanodine receptors</i>
<b>SERCA</b>	Del inglés <i>Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase</i>
<b>SERT</b>	Del inglés <i>Serotonin Transporter</i>
<b>SICs</b>	Del inglés <i>Slow Inward Currents</i>
<b>SNc</b>	Sustancia negra <i>pars compacta</i>
<b>SR</b>	Reconocimiento social, del inglés <i>Social Recognition</i>
<b>SSRI</b>	Del inglés <i>Selective Serotonin Reuptake Inhibitors</i>
<b>STT</b>	Somatostatina
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TCB-2</b>	4-bromo-3,6-dimetoxibenzociclobuten-1-il metilamina hidrobromida
<b>TD</b>	Trastorno depresivo
<b>TDAH</b>	Trastorno por déficit de atención e hiperactividad
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Del inglés <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
<b>TOC</b>	Trastorno obsesivo compulsivo
<b>TP</b>	Células del tracto piramidal
<b>TPC</b>	Del inglés <i>Two Pore Channels</i>
<b>TPH</b>	Triptófano hidroxilasa
<b>TRP</b>	Del inglés <i>Transient Receptor Potential</i>
<b>TRPML</b>	Del inglés <i>Transient Receptor Potential Mucolipin</i>
<b>TTX</b>	Tetrodotoxina
<b>VIP</b>	Péptido intestinal vasoactivo, del inglés <i>vasoactive intestinal peptide</i>
<b>VTa</b>	Del inglés <i>Ventral Tegmental Area</i>

## Resumen

Los astrocitos desempeñan un papel crucial en la homeostasis cerebral, actuando como elementos reguladores de la fisiología sináptica y neuronal. Tal es su implicación, que su actividad tiene un impacto a nivel de los circuitos cerebrales, afectando en última instancia al comportamiento animal. Asimismo, la alteración en la morfología y funciones de los astrocitos se ha relacionado con diversos desórdenes psiquiátricos, incluyendo el Trastorno Depresivo (TD). Esta enfermedad psiquiátrica es un problema público de salud mundial que se caracteriza por la presencia de alteraciones cognitivas y psicosociales, incluyendo alteraciones en la atención, en las funciones ejecutivas y en procesos de aprendizaje y memoria. Estas alteraciones están relacionadas con disfunciones del sistema monoaminérgico, destacando la señalización serotoninérgica. Así, el sistema serotoninérgico constituye un elemento crítico para la comprensión de la psicopatología del TD, siendo la principal diana en los tratamientos antidepresivos, centrados en corregir la disfunción de la señalización serotoninérgica. Los astrocitos expresan receptores y transportadores para serotonina (5-HT), pudiendo participar de la señalización serotoninérgica en los circuitos cerebrales. Sin embargo, el conocimiento de las dinámicas de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) en astrocitos y su relación con el sistema serotoninérgico en el TD es aún limitado. En este contexto, la presente tesis doctoral tiene por **objetivo** comprender el papel que juega la comunicación astrocito-neurona en la señalización serotoninérgica tanto en condiciones fisiológicas, como en el TD.

Para abordar este objetivo, utilizando como modelo experimental el ratón, se empleó una combinación multidisciplinar de **métodos experimentales y analíticos**, que incluyen: i) registros de imagen de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos a nivel poblacional (*in vivo*) durante paradigmas comportamentales de interacción social, y a nivel de célula individual (*ex vivo*), en rodajas de cerebro de corteza prefrontal medial (CPFm); ii) Análisis de la liberación de 5-HT en CPFm mediante el uso de un sensor específico *in vivo*; iii) Registros electrofisiológicos de *patch-clamp* en rodajas de CPFm para el estudio de la actividad sináptica; iv) Optogenética para la activación de poblaciones neuronales del núcleo dorsal del rafe (NDR); v) Quimiogenética (DREADDS) para la modulación de la actividad de los astrocitos durante la ejecución de paradigmas comportamentales; vi) Identificación histológica de poblaciones celulares y marcadores de membrana; vii) Análisis computacional.

Los **resultados** obtenidos muestran por primera vez la disfunción en la comunicación serotoninérgica entre neuronas y astrocitos en un modelo murino de TD. Este modelo, basado en un tratamiento crónico con corticosterona en ratones (ratones Cort), presentó alteraciones en la morfología y en las dinámicas de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos de CPFm, tanto en condiciones basales como durante la interacción social, en línea con una alteración del comportamiento de los ratones Cort. Además, estos ratones mostraron una reducción en la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por 5-HT en astrocitos de la CPFm, así como una plasticidad sináptica alterada inducida por 5-HT en las neuronas de la capa 2/3 de la CPFm. Con el fin de estimular la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos de ratones Cort se utilizó una estrategia quimiogenética con Gq-DREADDS.

Sorprendentemente, la potenciación selectiva de la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos con Gq-DREADDS restableció a niveles control las principales alteraciones comportamentales de los ratones Cort, incluyendo las habilidades cognitivas y sociales. En cambio, la aplicación de esta estrategia quimiogenética en ratones control ejerció un efecto negativo sobre la conducta, recapitulando los principales déficits asociados al TD. De esta manera se pone de manifiesto la estrecha relación entre la modulación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos y el rendimiento cognitivo.

En **conclusión**, estos resultados destacan el importante papel de la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos para el control homeostático de los circuitos cerebrales y el comportamiento, al mismo tiempo que revela su potencial valor terapéutico para el TD.



## Abstract

Astrocytes play crucial roles in brain homeostasis, acting as regulatory elements of neuronal and synaptic physiology. Such involvement has an impact at the level of brain circuits, ultimately affecting animal behavior. Moreover, altered astrocytic morphology and functions have been linked to various psychiatric disorders, including Major Depressive Disorder (MDD). MDD is a worldwide public health problem characterized by the presence of cognitive and psychosocial alterations, including disruptions in attention, executive functions and learning and memory processes. These changes are related to monoaminergic system dysfunctions, with particular emphasis on the serotonergic signaling. Therefore, serotonergic system constitutes a critical element for understanding the psychopathology of MDD, being the main target for antidepressant treatments, focused on correcting serotonergic signaling dysfunctions. Astrocytes express both serotonin (5-HT) receptors and transporters, which might participate in serotonergic signaling in brain circuits. However, the consequences of astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics in astrocytes and their relationship with serotonergic signaling in MDD are poorly understood. In this context, the main **goal** of this doctoral thesis is to understand the role of astrocyte-neuron communication in serotonergic signaling both in physiological conditions and MDD.

To address this goal, using mice as an experimental model, a combination of multidisciplinary **experimental and analytical methods** was employed, including: i)  $\text{Ca}^{2+}$  imaging recordings in astrocytes both at a population level (*in vivo*) during social interaction behavioral paradigms, and at the level of individual cells (*ex vivo*) in medial prefrontal cortex (mPFC) brain slices; ii) Analysis of 5-HT release in mPFC using a specific sensor *in vivo*; iii) Electrophysiological patch-clamp recordings in mPFC slices to examine synaptic activity; iv) Optogenetics to activate neuronal populations of the dorsal raphe nucleus (DRN); v) Chemogenetics (DREADDS) for astrocytic modulation during the performance of behavioral paradigms; vi) Histological analysis of different cell populations and membrane markers; vii) Computational analysis.

The present **results** reveal for the first time the existence of dysfunctional serotonergic neuron-astrocyte signaling in a mouse model of MDD. This model, based on chronic corticosterone treatment in mice (Cort mice), showed alterations in morphology and  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics in astrocytes of mPFC, both in resting conditions and during social interactions, in line with an altered Cort mice behavior. Additionally, Cort mice displayed reduced 5-HT-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in mPFC astrocytes, and aberrant 5-HT-driven synaptic plasticity in layer 2/3 mPFC neurons. In order to stimulate astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in Cort mice, a chemogenetic strategy with Gq-DREADDS was employed. Remarkably, boosting astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  with Gq-DREADDS restored to control levels the main behavioral alterations shown by Cort mice, including cognitive and social abilities. In contrast, the same chemogenetic strategy in control mice had a negative effect on behavior, recapitulating the main deficits associated with MDD. These results highlight the close relationship between the modulation of  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in astrocytes and cognitive performance.

In **conclusion**, the results shown indicate the crucial role of  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in astrocytes for the homeostatic control of brain circuits and behavior, but also revealed its potential therapeutic value for MDD.



# - CAPÍTULO I - INTRODUCCIÓN

---

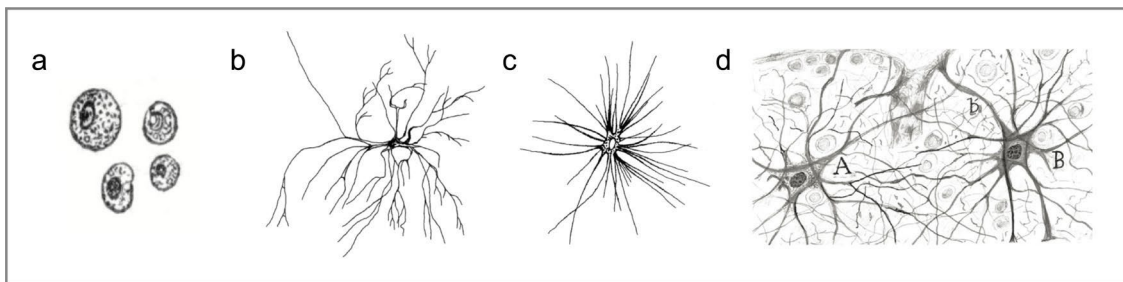


# I. Introducción

## 1. Papel de los astrocitos en la actividad cerebral

En el apasionante recorrido por los distintos descubrimientos sobre el cerebro y su complejidad, es preciso detallar la aparición en la historia de las células de glía y en particular de los astrocitos y su importancia para el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso.

Resulta de gran interés observar cómo se ha ido perfilando la morfología (Figura I1) y función de las células de glía desde su descubrimiento. Relatando brevemente antecedentes históricos, en 1856 el patólogo Rudolf Virchow describió por primera vez el término *neuroglía*, como una “sustancia conectiva en la que se incrustan los elementos del sistema nervioso” (Virchow 1856), considerándose así como un “pegamento del sistema nervioso”, un verdadero tejido conjuntivo, en el que no diferenciaba la existencia de tipos celulares individuales (Figura I1a).



**Figura I1. Ilustraciones de la neuroglía.** (a) Neuroglía representada por Virchow. Imagen modificada a partir de Verkhatsky y Butt, 2013 (b) Astrocito representado por Otto Deiters. Imagen modificada a partir de Deiters, 1865. (c) Célula neuroglial ilustrada por Camilo Golgi en 1871, modificada a partir de Verkhatsky y Butt, 2013. (d) Astrocitos perivasculares de la corteza cerebral humana, representado por Santiago Ramón y Cajal. Imagen modificada a partir de Verkhatsky y Nedergaard, 2018.

A partir de esta descripción se acuña el término *glía* que proviene del griego y significa pegamento. En 1865, en una publicación de Otto Deiters, aparece la primera imagen (Figura I1b) de lo que décadas después conoceríamos por el nombre de *astrocito* (del griego *astron*-estrella y *kutos*-recipiente) (Deiters 1865), acuñado por Michael von Lenhossék de Würzburg (Lenhossék 1895). Previamente, Camilo Golgi había realizado las primeras observaciones histológicas de la neuroglía (Golgi 1873), en las que describía las características morfológicas de astrocitos (Figura I1c) y oligodendrocitos, y definía por primera vez los contactos entre la glía y la vasculatura. Este hallazgo le llevó a teorizar sobre la función de la glía como soporte trófico de las neuronas. Adicionalmente, Carl Weigert proponía la teoría de que la glía tenía una función totalmente pasiva en el sistema nervioso, una función de relleno de los espacios entre las neuronas, siendo así un soporte estructural para las mismas (Weigert 1895). La carencia de técnicas y herramientas para arrojar nuevos datos sobre la función de estas células de glía mantuvo en vigor durante casi un siglo las teorías del relleno y el soporte trófico.

Así, los astrocitos fueron reconocidos históricamente como elementos de soporte trófico y estructural que jugaban un rol pasivo y homeostático sobre la transmisión sináptica, a través del tamponamiento del ion potasio o el aclaramiento de transmisores (Golgi 1885; Lugaro 1907). Sin embargo, Santiago Ramón y Cajal cuestionaba estas teorías, proponía conceptos pioneros sobre la relevancia de las células gliales en la función cerebral y relataba que la dificultad en el estudio funcional de la neuroglía se debía a limitaciones metodológicas (Ramón y Cajal 1899). Estas limitaciones comienzan a desaparecer en la década de 1990 con la llegada de las técnicas de imagen de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) que permiten monitorizar los cambios en el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (Cornell-Bell et al., 1990; Charles et al., 1991). Esto hace que se retome el estudio de los astrocitos, y se demuestra que las neuronas no son las únicas protagonistas en la comunicación cerebral, sino que los astrocitos participan a través de una excitabilidad basada en variaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Desde entonces, en las últimas décadas se ha puesto de manifiesto la existencia de un papel activo por parte de los astrocitos, a través de la liberación de gliotransmisores, lo que tiene un efecto sobre la actividad sináptica (Araque et al., 1998; Lehre y Rusakov, 2002; Araque et al., 2014). Así, se constató la participación directa de estas células en la función sináptica, revelando la existencia de comunicación bidireccional entre astrocitos y neuronas. Con ello, se acuñó un nuevo concepto en la fisiología de la sinapsis: **la sinapsis tripartita** (Araque et al., 1999). Esto llevó a redefinir el concepto clásico de sinapsis. De tal manera que la información fluye entre las neuronas pre- y postsinápticas y los astrocitos intercambian información con ellas, respondiendo a la actividad sináptica y regulando la transmisión (Araque et al., 1999; Perea et al., 2009).

Han sido necesarios muchos años y todavía nos encontramos en proceso, a pesar de los avances tecnológicos, de comprender la función de los astrocitos en el entramado del tejido nervioso. Actualmente podemos decir que la función cerebral surge de la actividad coordinada de una red que incluye tanto a las neuronas como a las células de glía (Perea et al., 2009). A partir de esta afirmación surgen muchas preguntas que tratan de dar respuesta al papel de los astrocitos en diferentes escalas: a nivel sináptico, a nivel de circuito y, por último, a nivel de sistemas.

A medida que se avanza en la comprensión de la función de los astrocitos en el cerebro, surge la necesidad de estudiar su papel en distintos desórdenes del sistema nervioso. En particular hay un creciente interés en explorar su relación con enfermedades psiquiátricas, como el trastorno depresivo (TD). En esta enfermedad, los esfuerzos realizados para entender su patofisiología y su patogénesis se han enfocado en gran medida en el estudio de las alteraciones neurológicas (Manji et al., 2001; Sliz y Hayley, 2012). Sin embargo, se ha constatado que la comprensión completa de esta enfermedad no puede lograrse únicamente desde una perspectiva neuronal, limitándose exclusivamente a estudiar la alteración de los circuitos neuronales implicados (Sanacora y Banasr, 2013; Elsayed y Magistretti, 2015). Por ello, uno de los desafíos actuales es desenmascarar el rol de los astrocitos en el TD, desde una perspectiva que englobe la comunicación astrocito-neurona.

## 1.1. Excitabilidad de los astrocitos: señalización de $\text{Ca}^{2+}$

La excitabilidad de los astrocitos se descubrió a principios de la década de los 90 gracias a los avances en las técnicas de imagen y fluorescencia (Cornell-Bell et al., 1990; Charles et al., 1991) y desde entonces se ha estudiado con gran detalle (Srinivasan et al., 2015; Khakh y McCarthy, 2015; Bazargani y Attwell, 2016; Guerra-Gomes et al., 2018; Lia et al., 2021; Goenaga et al., 2023). A diferencia de las neuronas, cuya excitabilidad se basa en cambios de voltaje a través de la membrana plasmática, la excitabilidad de los astrocitos está vinculada a variaciones en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Cornell-Bell et al., 1990; Charles et al., 1991). Este descubrimiento fue fundamental para proponer la contribución de estas células a la función de los circuitos neuronales y empezar a hablar de circuitos neuro-gliales (Haydon, 2000; Bezzi y Volterra, 2001; Perea et al., 2014a; Mederos et al., 2018; Linne et al., 2022).

Sin embargo, es preciso destacar que los astrocitos no son células “eléctricamente mudas”, y aunque no pueden generar potenciales de acción expresan en su membrana una gran cantidad de canales iónicos, como los canales de potasio (canales rectificadores de potasio, Kir4.1 y canales de fuga) (Poopalasundaram et al., 2000; Goldstein et al., 2001) que permiten la estabilidad de su potencial de membrana (cercano al potencial de equilibrio del potasio) y la homeostasis iónica. Además, expresan en concentraciones relativamente bajas canales dependientes de voltaje (Sontheimer et al., 1994; Verkhratsky y Nedergaard, 2018), lo que no permite que se generen cambios rápidos en su potencial de membrana (Verkhratsky y Nedergaard, 2018).

En cuanto a las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , lejos de ser señales *on-off*, son respuestas complejas (Volterra et al., 2014; Shigetomi et al., 2016) y para su estudio ha sido necesario mejorar las técnicas en el campo de la microscopía, así como avanzar en el desarrollo de herramientas genéticas para visualizar de forma selectiva la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos y poder así estudiarlas en detalle. Sin duda, el entendimiento de las dinámicas de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares en los astrocitos es fundamental para poder comprender el rol de estas células en los circuitos neuronales (Shigetomi et al., 2016).

Las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos pueden desencadenarse de manera espontánea (Parri et al., 2001; Nett et al., 2002) o ser evocadas por diferentes estímulos como la estimulación mecánica (Charles et al., 1991), la existencia de ligandos exógenos, o la liberación de neurotransmisores desde los terminales pre- o postsinápticos durante la actividad sináptica (Porter y McCarthy 1996; Perea y Araque 2005b, a; Perea et al., 2009). Esto último debido a la gran diversidad de receptores funcionales expresados en astrocitos para los distintos neurotransmisores liberados por las neuronas (Porter y McCarthy 1997; Araque et al., 2001).

Para estudiar las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos es preciso conocer dónde y cómo se generan estas señales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura I2). El principal reservorio de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos es el retículo endoplasmático (RE) que presenta en su membrana receptores para inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3) mayoritariamente de tipo 2 (IP3R2) (Holtzclaw et al., 2002) y de rianodina (RyR, del inglés

*Ryanodine receptor*). Estos receptores pueden ser activados por IP3 y por  $\text{Ca}^{2+}$ , respectivamente, desencadenando la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE hacia el citosol (Golovina y Blaustein, 1997; Parpura y Zorec, 2010). Esta liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  puede ser iniciada por varios factores como la estimulación de receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G $\alpha$ q (GPCR, del inglés *G Protein-Coupled Receptors*) expresados en la membrana astrocitaria, que desencadena la activación de la fosfolipasa C (PLC, del inglés *Phospholipase C*), la producción de IP3 y la activación de los receptores para IP3 (IP3Rs) en las membranas del RE (Perea et al., 2009); la existencia de puntos locales en el citoplasma donde el  $\text{Ca}^{2+}$  se encuentre elevado, lo que actúa como un coagonista de los IP3Rs (Khakh y McCarthy, 2015); o el llenado de  $\text{Ca}^{2+}$  en una región restringida en el interior del RE (Khakh y McCarthy, 2015).

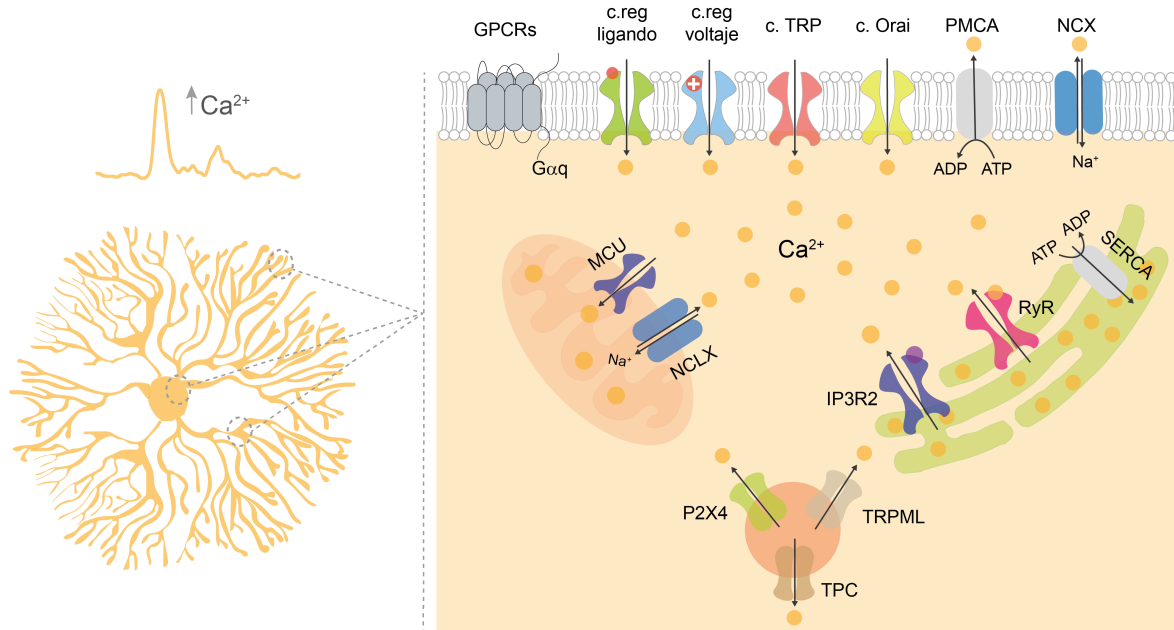
El RE en los astrocitos puede encontrarse distribuido por todo el interior celular, en el soma, en los procesos principales (Okubo y Iino, 2020) y también en los procesos astrocitarios perisinápticos (Bergersen et al., 2012), en estrecha asociación con las uniones de adhesión (*puncta adherentia*) entre las espinas dendríticas y los procesos astrocitarios (Spacek y Harris, 1998).

Además del RE, también se ha demostrado la existencia de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en el interior de las mitocondrias (Agarwal et al., 2017) (Figura I2). El  $\text{Ca}^{2+}$  puede ser liberado por este orgánulo de forma lenta gracias a la acción de un transportador  $\text{Na}^{+}\text{-Ca}^{2+}$  (NCLX, del inglés *sodium/lithium/calcium exchanger*) (Boyman et al., 2013). Adicionalmente, las mitocondrias pueden encontrarse en estrecho contacto físico con el RE, lo que permite la transferencia de  $\text{Ca}^{2+}$  entre ambos orgánulos, así de manera conjunta ambos pueden influir en la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos (Rizzuto et al., 1993; Serrat et al., 2021). Además, un estudio reciente ha demostrado que la estimulación de receptores para cannabinoides tipo 1 en las mitocondrias promueve la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en estos orgánulos, regulando así las dinámicas de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y jugando un papel en la integración de la actividad sináptica (Serrat et al., 2021).

Otros reservorios de  $\text{Ca}^{2+}$  menos estudiados son el aparato de Golgi que expresa receptores para IP3 y RyR para la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  y los lisosomas que también contribuyen al aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico a través de los canales TPC (del inglés *Two Pore Channels*) y de receptores TRPML (del inglés *Transient Receptor Potential Mucolipin*) y P2X4 (del inglés *Purinergic Receptor 4*) (Figura I2) (Patel y Docampo, 2010).

La vía IP3 es una de las principales en desencadenar estas elevaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (Holtzclaw et al., 2002; Fiacco y McCarthy, 2004; Navarrete et al., 2012), no obstante, la concentración de este ion también puede regularse de manera dinámica a través de la participación de distintos canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (regulados por ligando o por voltaje), bombas (PMCA, del inglés *Plasma Membrane  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase*) y transportadores ( $\text{Na}^{+}\text{-Ca}^{2+}$ , como NCX) (Shigetomi et al., 2016) (Figura I2). Entre ellos cabe destacar a los receptores de la familia TRP (del inglés *Transient Receptor Potential*) expresados en la membrana de los astrocitos y en concreto el canal TRPA1, que regula los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  basales (Shigetomi et al., 2011, 2013).





**Figura I2. Vías de señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos.** Esquema de las principales fuentes de  $\text{Ca}^{2+}$  y su localización en los distintos compartimentos celulares, soma, procesos principales y procesos finos de astrocitos. Los cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular están regulados de manera dinámica a través de la participación de canales, bombas y transportadores para  $\text{Ca}^{2+}$  expresados en la membrana plasmática y en la membrana de orgánulos como el retículo endoplasmático, la mitocondria y los lisosomas. En el retículo endoplasmático se muestra la expresión de receptores IP3R2 y RyR y la bomba ATPasa (SERCA, del inglés *Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase*). En la mitocondria se muestra la expresión de los transportadores  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$  (NCLX) y el transportador uniporte para  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial (MCU, del inglés *Mitochondrial Calcium Uniporter*). En el lisosoma se muestra la expresión de los canales TPC (del inglés *Two Pore Channels*), los receptores TRPML (del inglés *Transient Receptor Potential Mucolipin*) y P2X4 (del inglés *Purinergic Receptor 4*). En la membrana plasmática se localizan receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), c. reg (canales regulados) por ligando o por voltaje, c. (canales) TRP, c. (canales) Orai, bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa (PMCA del inglés *Plasma Membrane  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase*) y transportadores NCX (del inglés *sodium calcium exchanger*). Círculo naranja: ion  $\text{Ca}^{2+}$ , círculo violeta: IP3. Adaptado de Shigetomi et al., 2016.

Otro de los retos que ha surgido en el estudio de la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos es delimitar la localización de estos eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro del astrocito. Inicialmente, se estudió la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  restringida al soma y a procesos principales del astrocito (Cornell-Bell et al., 1990; Parpura et al., 1994). Sin embargo, investigaciones posteriores se enfocaron en procesos más finos y distales del soma, revelando que estas elevaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  pueden permanecer localmente restringidas o eventualmente propagarse a los procesos principales y al soma (Pasti et al., 1997; Bindocci et al., 2017). Estos eventos localizados de  $\text{Ca}^{2+}$  se describieron inicialmente como microdominios en los procesos de la glía de Bergmann, un tipo especializado de astrocitos localizados en el cerebelo, gracias a la combinación de análisis de ultraestructura, reconstrucción tridimensional y estudios fisiológicos (Grosche et al., 1999). Posteriormente, se observaron microdominios en diferentes preparaciones cerebrales *ex vivo* e *in vivo*, convirtiéndose en el foco de varios estudios y revisiones recientes (Volterra et al., 2014; Bazargani y Attwell, 2016; Semyanov et al., 2020). Actualmente, debido al conocimiento aún limitado sobre estos eventos, no existe una definición estricta y compartida de microdominios en el campo (Lia et al., 2021),

pero pueden definirse como los eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  que están restringidos a pequeñas porciones de territorios individuales de los astrocitos, constituyendo la unidad elemental de elevación de  $\text{Ca}^{2+}$  (Pasti et al., 1997), que utilizando técnicas de imagen de alta resolución pueden asignarse a procesos finos (Lia et al., 2021). El estudio de estos microdominios es difícil de abordar debido a la alta complejidad de sus perfiles espaciales y temporales (Shigetomi et al., 2013; Srinivasan et al., 2015; Agarwal et al., 2017; Bindocci et al., 2017; Semyanov et al., 2020). En cuanto al aspecto temporal, los eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos son generalmente más lentos que los de las neuronas a nivel somático (Lia et al., 2021), sin embargo, los microdominios pueden exhibir cinéticas rápidas en una escala de tiempo similar a la de las neuronas (Stobart et al., 2018). Además, cada vez más estudios apuntan a que la actividad intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en estos microdominios, es donde ocurren las transiciones “más importantes”, aquellas que son cruciales para la cooperación dinámica con las neuronas (Bazargani y Attwell, 2016; Lia et al., 2021).

Por otro lado, si consideramos el aspecto espacial de estas dinámicas de  $\text{Ca}^{2+}$ , el análisis de la misma ha revelado que estas señales una vez generadas pueden expandirse a regiones adyacentes dentro de un mismo proceso, a procesos diferentes, a la célula completa y también a células vecinas (Khakh y McCarthy 2015). De esta manera podemos distinguir dos tipos de oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  predominantes: las dinámicas basales y las ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  (Berridge et al., 2003).

Con respecto a las dinámicas de  $\text{Ca}^{2+}$  basales o espontáneas basadas en excitabilidad endógena que ocurren en ausencia de actividad neuronal (Perea y Araque 2005a), aunque aún no se conocen de manera completa, diversos estudios apuntan a que son fisiológicamente importantes para la célula (Nett et al., 2002; Berridge et al., 2003; Shigetomi et al., 2013, 2016). Las técnicas de microscopía de dos fotones (2P, del inglés *Two Photon*) y microscopía de fluorescencia de imágenes que mide los tiempos de vida de los fluoróforos con resolución espacial (FLIM, del inglés *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*), han permitido mapear estas oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  basales tanto *in vivo* como *ex vivo* revelando que: su concentración en los astrocitos era notablemente mayor que en las neuronas de cortes cerebrales de hipocampo; que estas concentraciones aumentan en los procesos, con respecto al soma; que existen poblaciones diferentes de astrocitos en función de la concentración de estas oscilaciones y que estas concentraciones parece que podrían disminuir en función de la edad de los ratones estudiados (Zheng et al., 2015). Todos estos datos proponen un importante papel funcional para estas señales de  $\text{Ca}^{2+}$  astrogliar. En relación con esto, se sugiere que cambios en la concentración basal de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos pueden tener un impacto en la actividad neuronal mediante la captación de neurotransmisores y la liberación de D-serina (Shigetomi et al., 2011, 2013), o también que estas señales podrían contribuir al desarrollo y maduración adecuados de la red neuronal (Parri et al., 2001).

En cuanto a las ondas de  $\text{Ca}^{2+}$ , son señales que pueden estar restringidas a un solo astrocito (intracelular) o transmitirse a células vecinas (intercelular). Con respecto a las ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares, son eventos espacial y temporalmente complejos que suelen estar desencadenados mediante la activación de receptores acoplados a proteínas G, la activación de

PLC y la producción de IP<sub>3</sub>, que, tras la activación de IP<sub>3</sub>R, conduce a la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde el RE (Sheppard et al., 1997; Fiacco y McCarthy, 2004). El Ca<sup>2+</sup> podría reclutarse en áreas restringidas del astrocito (Pasti et al., 1997; Araque et al., 2002) a partir de los cuales se propagaría por toda la célula mediante un mecanismo de amplificación (Scemes y Giaume, 2006). Esta amplificación estaría finamente regulada mediante dos mecanismos de retroalimentación positiva (la activación de receptores para IP<sub>3</sub> cercanos debido a la acción coagonista del Ca<sup>2+</sup> en estos receptores y la generación adicional de IP<sub>3</sub> a través de la activación dependiente de Ca<sup>2+</sup> de PLC) (Berridge 1993; Venance et al., 1997) y dos mecanismos de retroalimentación negativa (el poder amortiguador de las mitocondrias, atenuando los niveles excesivos de Ca<sup>2+</sup> en los microdominios de los receptores para IP<sub>3</sub> y la presencia de proteínas de unión a Ca<sup>2+</sup> de baja afinidad que limitan la difusión de iones de Ca<sup>2+</sup> dentro de los astrocitos individuales) (Wang et al., 1997; Boitier et al., 1999). Además, la extensión de la señal de Ca<sup>2+</sup> intracelular depende de los niveles de actividad sináptica. De esta manera, se ha comprobado que a frecuencias de estimulación sináptica bajas existe un aumento de Ca<sup>2+</sup> restringido espacialmente, mientras que niveles relativamente altos de actividad sináptica evocan la propagación de esta señal por toda la célula (Pasti et al., 1997; Grosche et al., 1999).

Por otro lado, la forma intercelular es conocida como la principal forma de comunicación existente entre astrocitos. Esta comunicación se basa en elevaciones de Ca<sup>2+</sup> originadas en un astrocito que pueden propagarse, sin disminuir, a astrocitos vecinos, pudiendo llegar a extenderse varios cientos de micrómetros (μm) (Cornell-Bell et al., 1990; Charles et al., 1991; Innocenti et al., 2000). Este tipo de comunicación se produce a través de uniones tipo gap, constituidas mediante el ensamblaje de hexámeros de proteínas transmembrana, conocidas con el nombre de conexinas, que ponen en contacto los citoplasmas de astrocitos contiguos (Orthmann-Murphy et al., 2008). Los mecanismos propuestos que subyacen a la aparición de estas ondas se basan en la difusión de IP<sub>3</sub> o de Ca<sup>2+</sup> de un astrocito a otro a través de estas uniones tipo gap (Höfer et al., 2002; Wallraff et al., 2006), o también, en la liberación de adenosín trifosfato (ATP) por parte del astrocito al espacio extracelular que activa receptores purinérgicos en la membrana de astrocitos contiguos (Fujii et al., 2017). Por tanto, este tipo de comunicación entre astrocitos por medio de la señal de Ca<sup>2+</sup>, podría dar lugar a que la actividad sináptica de una determinada región genere una respuesta de Ca<sup>2+</sup> que se transmita a un área más lejana y modular, de esta manera, la transmisión sináptica en otra región por medio de la actividad de los astrocitos (Navarrete y Araque, 2010).

### 1.1.1. Herramientas para estudiar la señalización de Ca<sup>2+</sup> en astrocitos

La señalización de Ca<sup>2+</sup> en los astrocitos se estudió durante décadas utilizando indicadores orgánicos de Ca<sup>2+</sup> (Fluo-4, Fura-2, OGB1, Green 1) que podían introducirse en el astrocito mediante la incubación con el mismo debido a su permeabilidad a la membrana o a través de la pipeta de registro (diálisis intracelular) (Cornell-Bell et al., 1990; Charles et al., 1991; Khakh y McCarthy, 2015). Sin embargo, a medida que se ha ido entendiendo el funcionamiento de estas dinámicas de Ca<sup>2+</sup>, se ha comprobado que el uso de estos indicadores limita el estudio temporal

y espacial de estas señales, de manera que señales rápidas y localizadas pueden pasar desapercibidas (Rusakov 2015), y las observadas se restringen al soma de los astrocitos o a los procesos proximales de mayor tamaño (Reeves et al., 2011). Además, en los experimentos de imagen de  $\text{Ca}^{2+}$  *in vivo* la visualización de estas sondas orgánicas se va perdiendo con el tiempo (Tong et al., 2013). Otro factor limitante es la falta de especificidad de estos indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$  pudiendo penetrar tanto en neuronas como en astrocitos (Garaschuk et al., 2006).

En este escenario, se han desarrollado diferentes herramientas genéticas como los indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$  codificados genéticamente o GECIs (del inglés *Genetically Encoded Calcium Indicators*) como GCaMP (Shigetomi et al., 2013), que suponen una mejora en la visualización (limitación de la fluorescencia a la morfología astrocitaria, aumentando la relación señal-ruido), y en el estudio de los eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares en astrocitos (Shigetomi et al., 2013; Srinivasan et al., 2015; Agarwal et al., 2017; Bindocci et al., 2017). Los niveles de expresión de GECIs se mantienen estables durante períodos de tiempo largos, lo que permite la realización de experimentos de imagen de  $\text{Ca}^{2+}$  crónicos *in vivo* (Paukert et al., 2014; Srinivasan et al., 2015), y en estudios agudos se observa poco fotoblanqueo de la señal (Shigetomi et al., 2013). A diferencia de las sondas orgánicas, los GECIs revelan señales de  $\text{Ca}^{2+}$  de astrocitos completos, pudiendo observar así su presencia en procesos finos (Shigetomi et al., 2013; Srinivasan et al., 2015).

Uno de los grandes avances en el estudio de la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos es la combinación de GECIs con los últimos progresos en el campo de la microscopía. De esta manera, se ha evolucionado desde la microscopía óptica de epifluorescencia que permite detectar y registrar dinámicas de  $\text{Ca}^{2+}$  espontáneas (Aguado et al., 2002), en respuesta a neurotransmisores (Araque et al., 2002) y ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  intercelulares en astrocitos en cultivo o en rodajas de cerebro (Fujii et al., 2017) a la microscopía confocal de barrido láser que puede monitorizar la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  a 10  $\mu\text{m}$  de profundidad en una rodaja de cerebro (Porter y McCarthy, 1996) hasta la microscopía de 2P que permite registrar señales de  $\text{Ca}^{2+}$  a cientos de  $\mu\text{m}$  de la superficie cortical (Wang et al., 2006). Además, la microscopía 2P se ha combinado con la microscopía FLIM, permitiendo así calcular la concentración absoluta de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Zheng et al., 2015). Teniendo en cuenta la complejidad estructural de los astrocitos y la presencia de eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  en microdominios a un nivel nanométrico se ha buscado el poder realizar un escaneo tridimensional de estas células utilizando para ello la microscopía 2P y posteriormente la microscopía de tres fotones (3P, del inglés *Three Photon*) pudiendo así implementar análisis estructurales y de imagen de  $\text{Ca}^{2+}$  a profundidades de 1,4 mm desde la superficie cortical (Bindocci et al., 2017; Streich et al., 2021). De esta manera, los últimos avances enfocados en estudiar las dinámicas de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos *in vivo* se centran en la combinación de lentes de índice de gradiente (GRIN, del inglés *Gradient-Index lens*) con microscopía de 2P y 3P para obtener imágenes en un campo de visión tridimensional (Chien et al., 2021; Streich et al., 2021), microscopía de fluorescencia en miniatura (miniscope, del inglés *miniature fluorescent microscope*), microscopía de fluorescencia de un solo fotón y Mini-2P (microscopio de 2P miniaturizado), permitiendo la observación de regiones más profundas del cerebro (Stamatakis et al., 2021; Zong et al., 2022). Estas técnicas hacen posible registrar oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  con una gran resolución celular y a nivel de célula individual, aunque al mismo tiempo todavía tienen que

enfrentarse a desventajas como la necesidad de hacer un implante invasivo para el animal, y retos técnicos en la adquisición y análisis de datos (Morita 2023). En línea con estos avances que posibilitan el estudio de las dinámicas de  $\text{Ca}^{2+}$  a nivel de célula única, también se han desarrollado técnicas para estudiar esta señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos a nivel poblacional como la fotometría óptica que permite monitorizar las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  en estructuras cerebrales profundas (Qin et al., 2020). La elección entre estas distintas técnicas dependerá del objetivo de análisis específico, la región del cerebro que se desee estudiar y las condiciones experimentales requeridas.

A pesar de los grandes avances en este campo, aún se requieren mejoras técnicas que permitan la manipulación selectiva de distintos subtipos de astrocitos, o de determinadas vías de señalización de  $\text{Ca}^{2+}$ , así como la detección de las distintas sustancias químicas liberadas por los astrocitos (Lyon y Allen, 2022).

### 1.1.2. Herramientas para modular la señalización de $\text{Ca}^{2+}$ en astrocitos

Existen distintas aproximaciones experimentales para modular la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos. Entre las herramientas para activar esta señalización destacan la estimulación mecánica de los astrocitos (Parpura et al., 1994; Araque et al., 1998), la fotoestimulación (Parpura et al., 1994), la aplicación local de agonistas selectivos (Martín et al., 2015), la utilización de ionóforos de  $\text{Ca}^{2+}$ , la fotólisis de jaulas de  $\text{Ca}^{2+}$  (o-nitrophenyl-EGTA, NP-EGTA) que retienen este ion hasta ser estimuladas mediante luz ultravioleta (Perea y Araque, 2007; Parpura y Zorec, 2010; Sasaki et al., 2012) y nuevos enfoques que presentan una mayor precisión celular y/o temporal como son la quimiogenética y la optogenética (Figura I3a).

El enfoque quimiogenético se basa en el uso de GPCRs modificados. Los astrocitos expresan una amplia variedad de GPCRs (Porter y McCarthy, 1997; Zhang et al., 2014) de los cuales se ha prestado especial atención a aquellos que promueven la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente del IP3R desde las reservas intracelulares del RE. Sin embargo, neuronas y otras células también expresan endógenamente GPCRs, por lo que lograr su activación selectiva en astrocitos ha resultado ser un desafío en rodajas de cerebro y en experimentos *in vivo* (Fiacco et al., 2009). En este sentido, el desarrollo y uso de receptores diseñados exclusivamente para ser activados por drogas diseñadas (DREADDs, del inglés *Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs*), acompañado de estrategias genéticas para dirigirlos específicamente a un tipo celular, ha sido extremadamente útil para conseguir este objetivo y poder modular la actividad de los astrocitos de manera selectiva (Figura I3a). Así, los DREADDs son GPCRs diseñados que tienen respuestas fuertemente atenuadas a sus ligandos endógenos y han sido diseñados para responder a activadores químicos sintéticos y biológicamente inertes (Roth, 2016; Whissell et al., 2016). Estos receptores pueden ser activados por el agonista selectivo clozapina-N-óxido (CNO), que puede atravesar la barrera hematoencefálica permitiendo su administración oral (agua o comida) o intraperitoneal (i.p.) (Roth 2016), ofreciendo una estimulación selectiva y relativamente no invasiva de las vías asociadas a los GPCR. Se han desarrollado varios tipos de DREADDs para dirigirse a las principales vías de señalización de la proteína  $\text{G}\alpha$ : hM3D acoplado



a Gαq (Armbruster et al., 2007), hM4D acoplado a Gαi (Armbruster et al., 2007; Vardy et al., 2015), rM3D acoplado a Gαs (Chai et al., 2017) y DREADDS acoplado a G<sub>12</sub> (Inoue et al., 2019). Estos receptores diseñados son quimeras entre receptores muscarínicos de humano o rata y el receptor adrenérgico-β1 del pavo para lograr una activación específica de la vía de la proteína G, y/o para generar mutaciones puntuales con el fin de eliminar la sensibilidad a los ligandos endógenos (Yu et al., 2020).

Los DREADDS se expresan selectivamente en una población celular deseada, generalmente a través de vectores virales incluyendo promotores específicos, o utilizando ratones transgénicos. El uso de vectores virales tiene la ventaja, en comparación con las líneas de ratones transgénicos, de lograr la expresión de DREADDS en la región específica del cerebro de interés, evitando el riesgo de una respuesta a gran escala tras la administración del agonista (Losi et al., 2017). De esta manera se ha comprobado que la utilización de vectores virales adenoasociados (AAVs, del inglés *Adeno-associated Virus*) para expresar DREADDS de manera selectiva en astrocitos de distintas áreas cerebrales y su estimulación mediante la aplicación del ligando CNO, induce elevaciones de Ca<sup>2+</sup> en los astrocitos similares a las señales de Ca<sup>2+</sup> mediadas por GPCRs endógenos (Pereira et al., 2023). Curiosamente esta señalización de Ca<sup>2+</sup> en los astrocitos se desencadenó independientemente de la utilización de DREADDS acoplados a proteínas Gαq, Gαi o Gαs (Chai et al., 2017; Durkee et al., 2019), al contrario del efecto diferencial que provocan estos DREADDS sobre el potencial de membrana neuronal. No obstante, se han observado diferencias en la magnitud de las elevaciones de Ca<sup>2+</sup> en astrocitos en función de la proteína G acoplada a los DREADDS utilizada y el área del cerebro estudiada (Chai et al., 2017; Durkee et al., 2019). Es importante considerar que con esta herramienta el tiempo de respuesta difiere sustancialmente de otras técnicas como la optogenética, que es tres órdenes de magnitud más rápida (Roth 2016; Losi et al., 2017). Se ha comprobado que la activación de DREADDS tiene lugar al cabo de 20-30 min tras la estimulación i.p. con CNO *in vivo* (Martin-Fernandez et al., 2017; Adamsky et al., 2018) y tiene una duración aproximada de al menos 1 hora (Roth, 2016). Por ello, esta estrategia quimiogenética es una buena opción para estudiar o recrear efectos o comportamientos de larga duración (Losi et al., 2017; Yu et al., 2020).

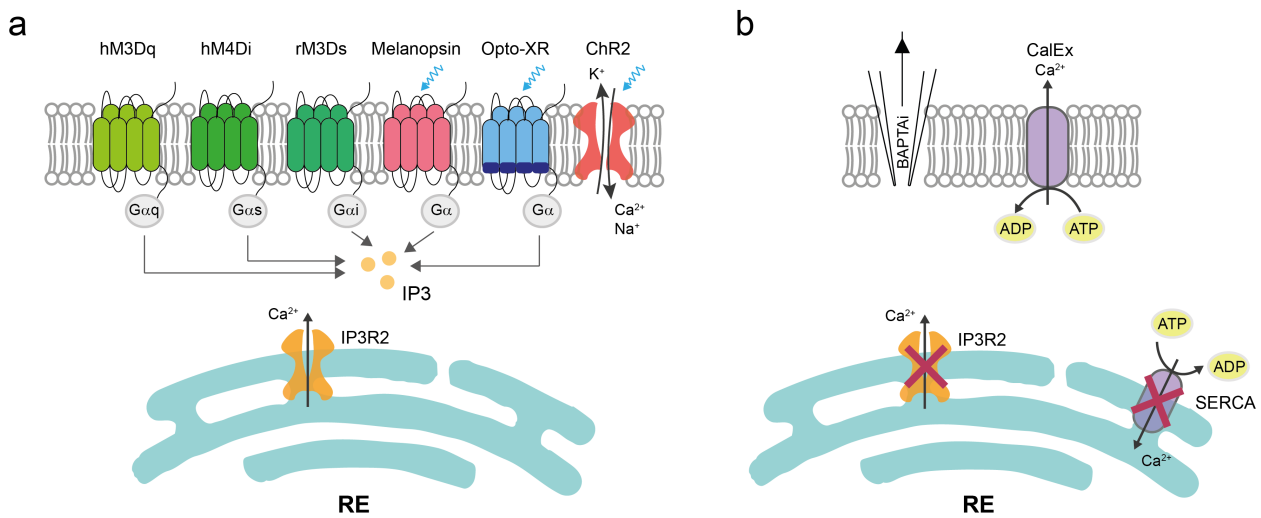
En cuanto a la optogenética, técnica aplicada primero en neuronas (Boyden et al., 2005), se basa en la combinación de la expresión selectiva de opsinas sensibles a la luz con herramientas ópticas para estimular o silenciar poblaciones neuronales definidas con precisión de milisegundos (Deisseroth 2015). Al mismo tiempo, se presenta como una herramienta clave para investigar la respuesta de los astrocitos a la señalización específica de distintos tipos neuronales (Losi et al., 2017). Se empleó por primera vez en astrocitos en 2009 (Gradinaru et al., 2009) mostrando la eficiencia de ChR2 (del inglés *Channelrhodopsin 2*) para modular los niveles de Ca<sup>2+</sup> astrocitario (Figura I3a), que a su vez puede desencadenar la liberación de gliotransmisores, incluyendo ATP o glutamato (Perea et al., 2014b; Cho et al., 2022). Por ello, distintos autores han utilizado esta herramienta en astrocitos con el fin de explorar las funciones de estas células en la regulación de diversos circuitos y su papel en comportamientos complejos (Yu et al., 2020). Estos experimentos arrojaron resultados destacados en el campo de la neurociencia, tales como la implicación de los astrocitos del tronco cerebral en el control de la respiración (Gourine et al., 2010), o la modulación de la integración de estímulos visuales en la corteza visual (Perea et al.,

2014b), la regulación del flujo sanguíneo (Masamoto et al., 2015), del sueño (Pelluru et al., 2016), de oscilaciones corticales lentas (Poskanzer y Yuste, 2016) o de la función motora en el cerebelo (Sasaki et al., 2012) a través de distintos mecanismos. Por tanto, esta herramienta permite estimular selectiva y eficientemente la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos. Sin embargo, ChR2 presenta algunas limitaciones en cuanto a la reproducción de la vía fisiológica que subyace al aumento de los eventos de  $\text{Ca}^{2+}$ , basada en la activación de GPCR, ya que ChR2 estimula la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por canales, lo cual podría no representar de forma adecuada las repuestas fisiológicas de los astrocitos inducidas por la actividad sináptica (Octeau et al., 2019).

En este contexto, el estudio realizado por Mederos y colaboradores supone un avance al utilizar una nueva herramienta, melanopsin, que sí puede recapitular la activación de GPCRs y con ello las respuestas endógenas de los astrocitos y su papel sobre los distintos circuitos cerebrales (Mederos et al., 2019). Melanopsin es un fotopigmento acoplado a proteínas G expresado en la membrana plasmática de un subconjunto de células ganglionares de la retina de mamíferos que puede ser activada por luz azul ( $\sim 470\text{--}480\text{ nm}$ ) (Hattar et al., 2002) (Figura I3a). Esta opsina se puede expresar en astrocitos utilizando estrategias virales y su activación desencadena aumentos en la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la vía IP<sub>3</sub>. De esta manera, mediante diferentes frecuencias y tiempos de fotoestimulación de melanopsin se pueden inducir distintas respuestas en astrocitos y en la modulación que producen estas células sobre la plasticidad sináptica. Así, protocolos de estimulación de melanopsin de 1–20 s en astrocitos hipocámpales aumentan la frecuencia de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  en procesos finos, mientras que la estimulación durante más de 10 s provoca señales de  $\text{Ca}^{2+}$  en los somas de los astrocitos (Mederos et al., 2019). Además, la estimulación con breves trenes de pulsos de luz induce una señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  de mayor magnitud en astrocitos, que se asocia con la potenciación de corrientes postsinápticas excitatorias evocadas en neuronas piramidales de CA1 imitando la potenciación a corto plazo (Mederos et al., 2019). En cambio, protocolos de baja frecuencia de fotoestimulación desencadenan una potenciación a largo plazo y pueden mejorar la memoria episódica, consistente con el efecto que provoca la estimulación de DREADDS *in vivo* en la misma población de astrocitos (Adamsky et al., 2018). Por tanto, melanopsin se presenta como una herramienta útil para estimular ópticamente los astrocitos de manera controlada en el tiempo e imitar los patrones oscilatorios endógenos de las vías asociadas a los GPCRs (Yu et al., 2020).

Otra estrategia utilizada para incrementar la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos se basa en el diseño de GPCRs sensibles a luz que reclutan las vías mediadas por G $\alpha_q$  en estas células y se conocen con el nombre de Opto-XRs (Figura I3a). En esta herramienta, los bucles intracelulares de las rodopsinas se reemplazan por  $\alpha$ -adrenoreceptores y  $\beta$ -adrenoreceptores para crear proteínas mutantes sensibles a la luz. La estimulación con altas frecuencias (20 Hz) de Opto- $\alpha$ 1-AR en astrocitos de hipocampo es capaz de modificar la transmisión glutamatérgica y GABAérgica (Courtney et al., 2023). Además, se ha comprobado que esta herramienta recapitula el efecto de fortalecimiento de la memoria asociada al miedo desencadenada por la estimulación de Gq- DREADDS en astrocitos del hipocampo (Adamsky et al., 2018). Por ello, la activación de Opto- XRs sería capaz de modular la actividad astrocitaria y sus efectos sobre distintos circuitos mediante una estimulación óptica con precisión temporal.

Por otro lado, se han desarrollado estrategias para inhibir o disminuir la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en el astrocito y con ello revelar su contribución a circuitos neuronales y al desarrollo de distintos comportamientos (Figura I3b) (Xie et al., 2010; Yu et al., 2018). Estas estrategias comprenden desde la utilización de quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$ , mediante la diálisis de BAPTA en astrocitos (Figura I3b) (Gómez-Gonzalo et al., 2010); el agotamiento de las reservas intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante el uso de inhibidores de bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  localizadas en el RE, como el ácido ciclopiazónico (Figura I3b) (Beck et al., 2004); la utilización de ratones transgénicos carentes de receptores IP3R2 (la isoforma predominante de IP3R en los astrocitos del cerebro de roedores) (Figura I3b) (Srinivasan et al., 2015), que permiten la atenuación de la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  espontánea y mediadas por  $\text{G}\alpha_q$ -GPCR en el soma de los astrocitos; la expresión del dominio *Pleckstrin Homology* de la proteína similar a PLC llamada p130 (p130PH), a través de vectores virales, que se ha utilizado para reducir la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos *in vivo* (Xie et al., 2010); hasta la utilización de bombas extrusoras de  $\text{Ca}^{2+}$  (CalEx) en los astrocitos (Figura I3b), para atenuar la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  independientemente de cuál sea la fuente del mismo (Yu et al., 2018). Este enfoque de extrusión de  $\text{Ca}^{2+}$  (CalEx) redujo la amplitud y la duración de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  espontáneas y mediadas por GPCR en aproximadamente un 80% en astrocitos del estriado, sincausar cambios evidentes en su frecuencia (Yu et al., 2018).

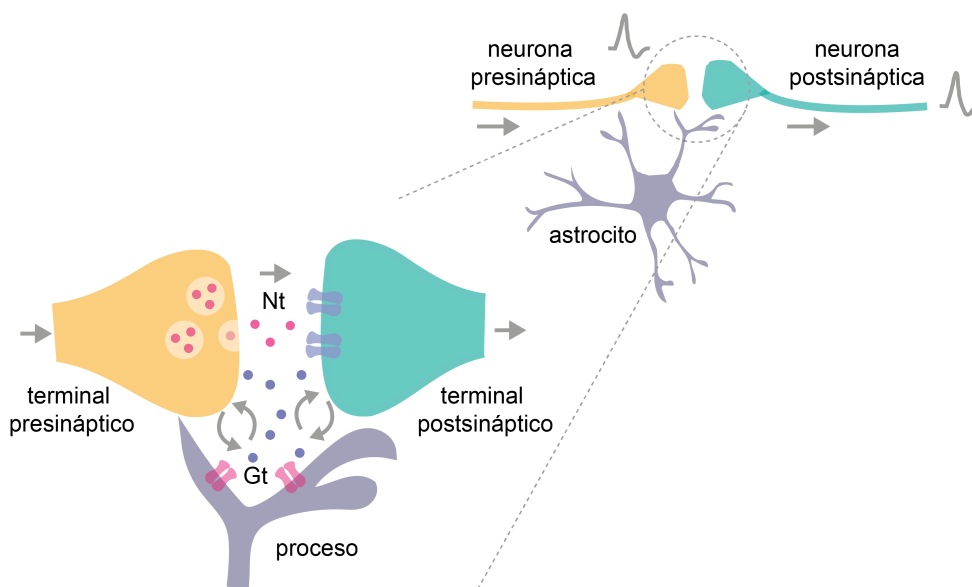


**Figura I3. Estrategias de manipulación de la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos.** **a)** Esquema de las principales estrategias genéticas para incrementar la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en astrocitos. Se muestran la expresión en la membrana plasmática de distintos tipos de DREADDs (hM3Dq, hM4Di, rM3Ds) y GPCRs fotoactivables (melanopsin y Opto-XR), que acoplados a distintas proteínas G confluyen en la vía de señalización IP3, así como canales fotoactivables (ChR2) que provocan un flujo no selectivo de cationes a través de la membrana plasmática. **b)** Esquema representando estrategias utilizadas para inhibir o disminuir la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos, basadas en: i) la diálisis de BAPTA (quelante de  $\text{Ca}^{2+}$ ) a través de la micropipeta de registro; ii) la inhibición genética de los receptores IP3R2; iii) la expresión de CalEx en la membrana plasmática, que bombea iones de  $\text{Ca}^{2+}$  al espacio extracelular; y, iv) la utilización de inhibidores de bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  localizadas en el RE (SERCA), induciendo el agotamiento de las reservas intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . Adaptado de Yu et al., 2020.



## 1.2. Comunicación astrocito-neurona

El concepto de la sinapsis tripartita, que describe la existencia de un intercambio bidireccional de señales entre astrocitos y neuronas (Araque et al., 1999) (Figura I4), permitió sustituir la idea neurocéntrica en la que la transmisión de la información en el sistema nervioso estaba únicamente protagonizada por las neuronas. Ello dio paso a una nueva idea que da cabida a la participación de los astrocitos, y otras células de glía, no solo a nivel sináptico (Eroglu y Barres, 2010; Perea et al., 2014a; Bazargani y Attwell, 2016), sino también a nivel de los circuitos cerebrales (Khakh y Sofroniew, 2015; Liu et al., 2021), y por último a nivel del organismo completo, jugando un papel fundamental en el funcionamiento de distintos comportamientos (Allen, 2019; Nagai et al., 2021).



**Figura I4. Sinapsis tripartita.** Representación esquemática del concepto de sinapsis tripartita mostrando la transferencia de información entre los elementos neuronales (neurona presináptica y postsináptica) y el astrocito. Los astrocitos responden con elevaciones de  $Ca^{2+}$  a los neurotransmisores (Nt) liberados durante la actividad sináptica y, controlan la excitabilidad neuronal y la transmisión sináptica a través de la liberación de gliotransmisores (Gt) dependientes del  $Ca^{2+}$ . Adaptado de Perea et al., 2009.

### 1.2.1. Implicación del astrocito en la sinapsis

Resultados recogidos durante las últimas décadas ponen de manifiesto la participación de los astrocitos en la regulación de la sinapsis (Araque et al., 2001; Haydon y Carmignoto, 2006; Mederos et al., 2019). Esta participación es diversa y comprende el control de la sinaptogénesis (Baldwin y Eroglu, 2017), la maduración sináptica (Blanco-Suarez et al., 2018), el mantenimiento y la reorganización de las conexiones sinápticas (Chung et al., 2015). Además, los astrocitos pueden sensar la actividad neuronal y modular su excitabilidad y la plasticidad sináptica a través

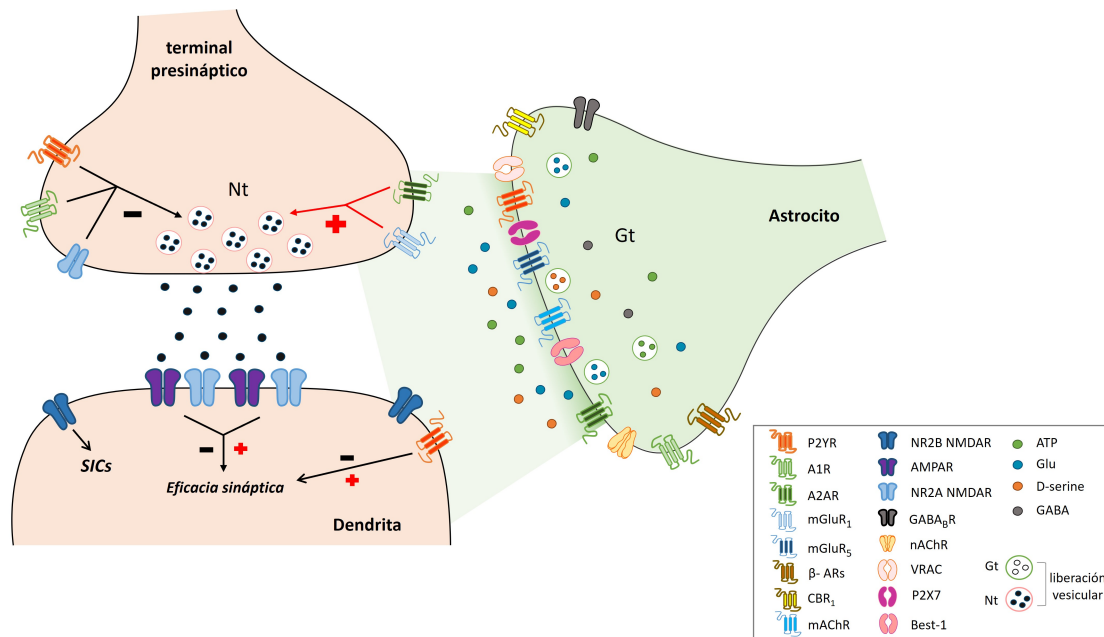
de la liberación de distintas sustancias neuroactivas, proceso que recibe el nombre de gliotransmisión (Kang et al., 1998; Araque et al., 1999, 2014; Perea y Araque, 2010).

Este concepto de gliotransmisión ha suscitado cierto debate entre la comunidad científica, cuestionándose la habilidad de los astrocitos para liberar compuestos neuroactivos en función de la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  (Agulhon et al., 2008; Fiacco et al., 2009), los mecanismos que subyacen a la liberación de los mismos y el papel fisiológico de la gliotransmisión (Li et al., 2013; Fiacco y McCarthy, 2018; Savtchouk y Volterra, 2018). Al margen de la controversia, existe un importante número de trabajos que demuestran que los astrocitos de distintas áreas cerebrales liberan sustancias neuroactivas las cuales inducen diversos efectos sobre la actividad sináptica (Parri et al., 2001; Haydon y Carmignoto, 2006; D'Ascenzo et al., 2007; Perea y Araque, 2007; Di Castro et al., 2011; Panatier et al., 2011; Min y Nevian, 2012; Navarrete et al., 2012; Zorec et al., 2012; Araque et al., 2014; Perea et al., 2014a; Martín et al., 2015; Martin-Fernandez et al., 2017; Guerra-Gomes et al., 2018; Durkee y Araque, 2019).

Es preciso tomar en consideración que los astrocitos expresan receptores de membrana para la gran mayoría de neurotransmisores y neuromoduladores, incluyendo glutamato, ácido gamma-aminobutírico (GABA), adenosina (Ado), noradrenalina (NA), serotonina (5-HT), acetilcolina (ACh) y endocannabinoides (eCBs) entre otros (Perea et al., 2009; Zorec et al., 2012; Zhou et al., 2019). La mayoría de estos neurotransmisores y neuromoduladores activan receptores acoplados a proteínas G, lo que puede derivar en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde depósitos intracelulares. Estas elevaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares, impulsadas por la señalización endógena o la actividad neuronal, pueden desencadenar la liberación de diferentes gliotransmisores como: glutamato, GABA, D-serina, ATP, Ado, factor de necrosis tumoral alfa ( $\text{TNF}\alpha$ , del inglés *Tumor Necrosis Factor alpha*), L-lactato o prostaglandinas, entre otros (Santello et al., 2012; Yoon y Lee, 2014), que pueden modular y controlar la actividad neuronal a través de mecanismos dependientes de exocitosis vesicular de gliotransmisores (Araque et al., 2000; Bezzi et al., 2004; Parpura y Zorec, 2010), o independientes de vesículas (difusión o translocación de gliotransmisores a través de canales y transportadores de membrana) (Duan et al., 2003; Volterra et al., 2014) (Figura I5).

Estos gliotransmisores contribuyen a la plasticidad sináptica a corto y largo plazo mediante la activación de receptores neuronales pre- y postsinápticos (Perea et al., 2014a). En este contexto, se ha demostrado que la activación sináptica glutamatérgica de los astrocitos estimula la liberación de glutamato, D-serina, ATP o Ado, que, a través de la activación de receptores pre- y postsinápticos, establece el umbral para la transmisión sináptica basal (Bonansco et al., 2011; Panatier et al., 2011), y potencia la plasticidad sináptica glutamatérgica a corto y largo plazo (Jourdain et al., 2007; Perea y Araque, 2007; Henneberger et al., 2010). Por otro lado, la actividad GABAérgica a través de la estimulación de la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos (Perea et al., 2016; Mariotti et al., 2018), puede inducir la liberación de glutamato por parte de estas células, potenciando la actividad sináptica excitadora (Perea et al., 2016) o de ATP y Ado, disminuyendo el tono sináptico excitador (Serrano et al., 2006; Covelo y Araque, 2018). La señalización por eCBs también puede involucrar a los astrocitos estimulando la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  e influyendo

en última instancia en la transmisión sináptica glutamatergica (Navarrete y Araque, 2010; Min y Nevian, 2012; Martín et al., 2015; Martin-Fernandez et al., 2017). Por otro lado, hay que tener en cuenta que los astrocitos también pueden responder de diferentes maneras a neuromoduladores como NA (Paukert et al., 2014), ACh (Navarrete et al., 2012), DA (Jennings et al., 2017), 5-HT (Kinoshita et al., 2018) y moléculas derivadas del sistema neuroendocrino (Kim et al., 2014) entre otras, afectando de este modo a circuitos neuronales específicos que a su vez rigen distintas respuestas conductuales (Mederos et al., 2018).



**Figura I5. Gliotransmisión.** Esquema de las diferentes acciones de la gliotransmisión sobre una sinapsis glutamatergica. Los astrocitos en respuesta a la actividad neuronal pueden liberar gliotransmisores (Gt), entre los que destacan ATP, glutamato, D-serina y GABA, entre otros, que modulan la excitabilidad neuronal y la transmisión sináptica actuando sobre receptores presinápticos y postsinápticos. β-AR: receptor beta-adrenérgico, A1R: receptor A1, A2AR: receptor A2A, AMPAR: receptor AMPA, Best-1: bestrofina-1, CBR1: receptor de cannabinoide 1, GABABR: receptor GABAB, Glu: glutamato, mAChR: receptor muscarínico de ACh, mGluR1: receptor metabotrópico glutamatergico 1, mGluR5: receptor metabotrópico glutamatergico 5, nAChR: receptor nicotínico de ACh, NR2A NMDAR: subunidad NR2A del receptor NMDA, NR2B NMDAR: subunidad NR2B del receptor NMDA, Nt: neurotransmisor, P2X7: receptor purinérgico 7, P2YR: receptor purinérgico metabotrópico Y, SICs: corrientes lentas de entrada, VRAC: canal de aniones regulado por volumen. Adaptado de González-Arias y Perea, 2019.

Este proceso de gliotransmisión, y su participación en la plasticidad sináptica, es un proceso complejo objeto de una intensa investigación. Además, a la relación entre los astrocitos y las sinapsis hay que añadirle distintos grados de complejidad como: la *heterogeneidad* de astrocitos en una misma o en distintas áreas cerebrales (Khakh y Sofroniew, 2015); el *dinamismo en la morfología* de los astrocitos, ya que, los procesos astrocitarios pueden extenderse y retraerse lejos de las sinapsis en el rango de unos pocos min (Perez-Alvarez et al., 2014); el *entorno neuronal* específico en el que se libera un gliotransmisor (Mederos et al., 2018); la *cobertura* que puede abarcar un único gliotransmisor, pudiendo actuar sobre distintas sinapsis, ejerciendo así un control diferencial de la neurotransmisión excitadora e inhibitoria (Martin-

Fernandez et al., 2017); la *morfología ramificada* de los astrocitos que permite que un único astrocito pueda estar en contacto con decenas de miles de sinapsis, pudiendo modular no solo sinapsis contiguas a un astrocito sino también sinapsis más alejadas (Ventura y Harris, 1999; Halassa et al., 2007b; Khakh y Sofroniew, 2015).

Por tanto, los astrocitos son elementos activos en las sinapsis, procesando e integrando la información sináptica en respuestas diversas y plásticas, mediante la liberación de diversos gliotransmisores, cuyo efecto sobre la actividad neuronal sería específico de la sinapsis, la célula y el circuito. De este modo, las diferentes formas de gliotransmisión estarían coordinadas adecuadamente con el entorno neuronal circundante (Durkee y Araque, 2019).

### 1.2.2. Implicación del astrocito en los circuitos cerebrales

Los astrocitos no solo poseen la capacidad de modular la transmisión y plasticidad sináptica, sino que también pueden tener un efecto a mayor escala, sobre las redes o circuitos neuronales (Guerra-Gomes et al., 2018; Lyon y Allen, 2022; Oliveira y Araque, 2022).

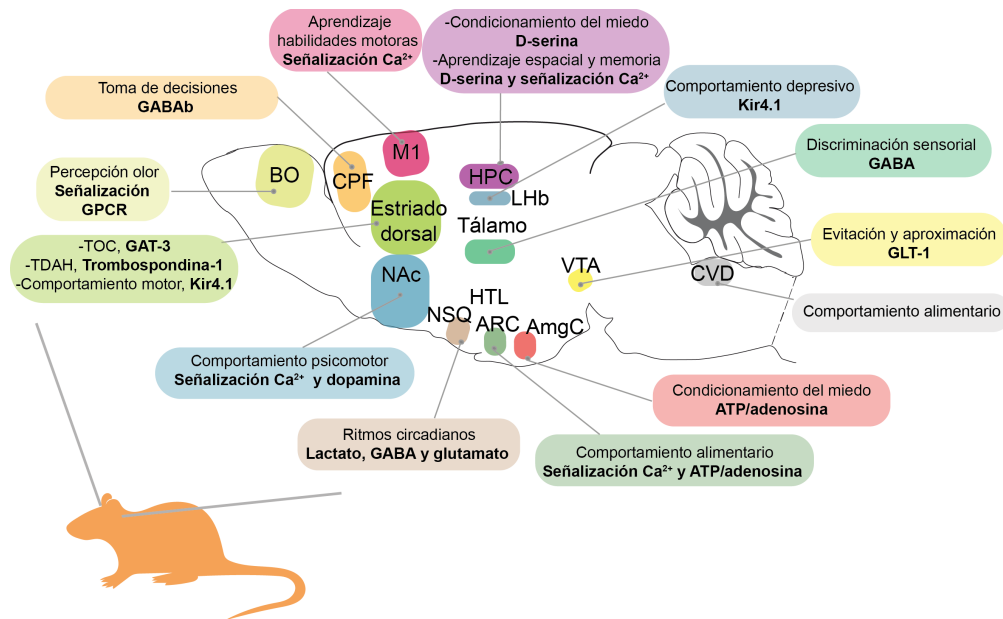
Así, distintos estudios muestran como los astrocitos regulan oscilaciones neuronales en diferentes áreas cerebrales a través de distintos mecanismos relacionados con la funcionalidad y homeostasis de estas células. Entre ellos, se ha demostrado que alteraciones en la capacidad de los astrocitos para regular los niveles de  $K^+$  extracelular tiene un efecto sobre las redes neuronales de distintas áreas cerebrales. En la corteza somatosensorial el bloqueo de los canales Kir4.1 en astrocitos induce un aumento de la excitabilidad neuronal, potenciando la actividad oscilatoria de las redes neuronales en un amplio rango de frecuencias (Bellot-Saez et al., 2018). En cambio, un aumento en la expresión de estos canales en astrocitos de la habénula lateral (LHb) aumenta los disparos neuronales y, con ello, la supresión de otros centros monoaminérgicos induciendo fenotipos semejantes a la depresión (Cui et al., 2018). Por otro lado, la alteración de los transportadores de glutamato expresados en astrocitos, que controlan la homeostasis de glutamato, induce una hiperexcitabilidad neuronal en la región infralímbica de la corteza prefrontal (CPF), causando una alteración en la comunicación con el núcleo dorsal del rafe (NDR), que aumenta el tono GABAérgico en esta región y disminuye la función serotoninérgica (Fullana et al., 2019a). Otros estudios resaltan la importancia del papel de los astrocitos como quimiosensores del microambiente extracelular en diferentes núcleos del tronco encefálico, mostrando como disminuciones fisiológicas del pH provocan un aumento del  $Ca^{2+}$  intracelular en los astrocitos y liberación de ATP por parte de estas células que activa neuronas quimiorreceptoras induciendo un aumento de la respiración, demostrando con ello el papel crucial de los astrocitos en la regulación de un reflejo fisiológico fundamental (Gourine et al., 2010). Otra característica funcional de los astrocitos es su capacidad de regular el  $Ca^{2+}$  extracelular a través de S100 $\beta$  (Morquette et al., 2015). Mediante esta regulación los astrocitos del núcleo mesencefálico trigeminal son capaces de responder a estímulos sensoriales e inducir y modificar patrones rítmicos de disparo neuronal, que regulan comportamientos de masticación (Morquette et al., 2015). En línea con el rol de la señalización de  $Ca^{2+}$  en la actividad de redes neuronales, se ha demostrado en la corteza somatosensorial

cómo un solo astrocito es capaz de activar a astrocitos contiguos desencadenando la sincronización de neuronas vecinas (Poskanzer y Yuste, 2011); y que a través de la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  evocada por GPCR-Gq, los astrocitos pueden reducir las oscilaciones gamma, modulando así la respuesta de las redes neuronales a la estimulación sensorial (Lines et al., 2020). Esta modulación de los circuitos neuronales por parte de los astrocitos también se ha demostrado en circuitos límbicos, donde la activación de receptores GPCR-Gq en astrocitos del centro medial de la amígdala disminuye la frecuencia de disparo neuronal en esta área, a través de la potenciación e inhibición de entradas inhibitorias y excitatorias, respectivamente a este núcleo (Martin-Fernandez et al., 2017). Por otro lado, también se ha demostrado como los astrocitos pueden modular la respuesta neuronal a la estimulación sensorial en otras áreas, como hipocampo o corteza prefrontal medial (CPFm). Asimismo, se ha demostrado que la eliminación selectiva de los receptores  $\text{GABA}_B$  en astrocitos favorece una disminución de las oscilaciones theta y gamma en el hipocampo tras la estimulación sensorial (Perea et al., 2016). En línea con estos experimentos, la ausencia de los receptores  $\text{GABA}_B$  en astrocitos de CPFm, induce también una reducción de las oscilaciones gamma en esta región, que se asocia con un rendimiento deficiente de la memoria de trabajo (Mederos et al., 2021).

Todos estos experimentos respaldan una clara participación de los astrocitos en la modulación de la actividad neuronal. Sin embargo, aún son necesarios experimentos que permitan evaluar cómo se traduce la actividad astrocitaria en la modulación de las oscilaciones y sincronización neuronales en distintas áreas cerebrales.

### 1.2.3. Implicación del astrocito en el comportamiento animal

Los avances metodológicos han permitido progresar en el conocimiento del rol de los astrocitos en los circuitos cerebrales, empezando así a descubrir las funciones que estas células desempeñan en el comportamiento (Nagai et al., 2021; Shigetomi y Koizumi, 2023). Numerosos estudios reflejan el papel crucial de la actividad astrocitaria en comportamientos complejos (Figura I6), como son las estrategias para afrontar el estrés (Miguel-Hidalgo 2022), la alimentación (Chen et al., 2016), la olfacción (Ung et al., 2020), el sueño (Bojarskaite et al., 2020), los ritmos circadianos (Brancaccio et al., 2019), la percepción (Lines et al., 2020), las funciones motoras (Oliveira et al., 2015), el aprendizaje y la memoria (Adamsky et al., 2018; Mederos et al., 2019), el miedo (Martin-Fernandez et al., 2017; Li et al., 2020), la cognición (Mu et al., 2019), el procesamiento sensorial (Perea et al., 2014b), la ansiedad (Tan et al., 2024) y la motivación (Shigetomi y Koizumi, 2023). Este amplio rango de funciones en las que los astrocitos están implicados muestra la habilidad de estas células para ajustar su fisiología de tal manera que puedan satisfacer continuamente las diversas demandas de la actividad neuronal y regular así distintos aspectos del comportamiento animal.



**Figura I6. Participación de los astrocitos en el comportamiento animal.** Esquema representando los distintos circuitos cerebrales y comportamientos asociados en los que se ha reportado la contribución de los astrocitos. AmgC: amígdala central, ARC: núcleo arcuato, BO: bulbo olfatorio, CVD: complejo vagal dorsal, HPC: hipocampo, HTL: hipotálamo, LHb: habénula lateral, M1: corteza motora primaria, NAc: núcleo accumbens, NSQ: núcleo supraquiasmático, TDAH: trastorno por déficit de atención e hiperactividad, TOC: trastorno obsesivo compulsivo, VTA: área tegmental ventral. Adaptado de Nagai et al., 2021.

En esta línea, se están planteando nuevos enfoques para el estudio de la función astrocitaria a gran escala, como el propuesto por Murphy-Royal y colaboradores (Murphy-Royal et al., 2023), que ofrece una perspectiva novedosa ligando la actividad de los astrocitos al contexto tanto externo (percepción e interacción con el entorno) como interno (evaluación interna del organismo y respuesta a estímulos o constantes internas) en el que se encuentren, de tal manera que pueden integrar esta información contextual y modular los circuitos cerebrales acorde a ello, adaptándose a los requerimientos de esos circuitos en un momento concreto.

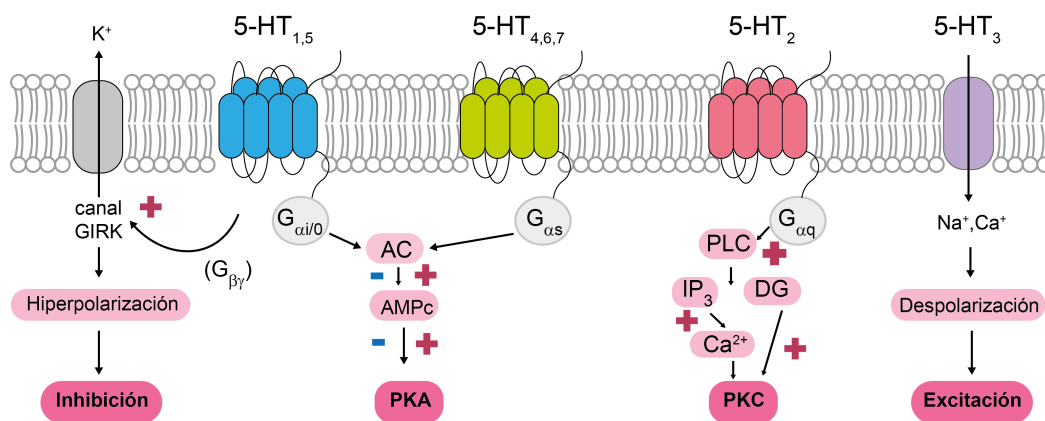
## 2. Sistema serotoninérgico

La serotonina o 5-hidroxitriptamina identificada por Rapport y colaboradores en 1948 (Rapport et al., 1948) es una molécula de señalización derivada del triptófano, filogenéticamente antigua (Hay-Schmidt 2000). Se sintetiza fundamentalmente en los núcleos localizados en el tronco encefálico y en las células enterocromafines intestinales y neuronas del plexo mientérico (Sirek y Sirek, 1970). Se caracteriza por ser muy ubicua, el 90% de 5-HT se localiza en el tracto gastrointestinal (Shah et al., 2021) y en el cerebro es el transmisor más ampliamente distribuido (Dahlström y Fuxe, 1964). Además, puede actuar como mensajero, neurotransmisor y/o neuromodulador en prácticamente todas las funciones fisiológicas, como son el control de la temperatura corporal, los ritmos respiratorios, la frecuencia cardíaca (Camilleri 2009), la alimentación y la motilidad intestinal (Camilleri 2009), la latencia eyaculatoria (de Jong et al.,



2006), el control de la vejiga (Hall et al., 2015), la relajación y contracción muscular (Feldman 2004), la locomoción (Correia et al., 2017), el ciclo vigilia-sueño (Monti 2011), el dolor (Cortes-Altamirano et al., 2018), el comportamiento social (Dölen et al., 2013), el estrés y la ansiedad (Lowry 2002), el aprendizaje y la memoria (Meneses 1998), la percepción sensorial, la emoción y la cognición (Berumen et al., 2012).

La señalización serotoninérgica es altamente compleja debido a la amplia variabilidad de receptores que presenta, y que se expresan de manera diferencial en las distintas áreas cerebrales y tipos celulares. Los múltiples receptores para 5-HT descritos (Berger et al., 2009) se pueden agrupar en 7 clases principales (5-HT<sub>1-7</sub>) en función de sus similitudes estructurales y funcionales (Hannon y Hoyer, 2008). Todos ellos pertenecen a la superfamilia de GPCRs excepto el receptor 5-HT<sub>3</sub> que es un canal iónico selectivo de cationes que pertenece a la superfamilia de receptores activados por ligando, que contienen bucles de cisteína (Hannon y Hoyer, 2008). Este receptor 5-HT<sub>3</sub> constituye un heteropentámero y su activación induce excitación neuronal y liberación de neurotransmisores (Figura I7). Los receptores 5-HT<sub>1,2,4,5,6,7</sub> están constituidos por siete dominios transmembrana y están ligados a diferentes proteínas G (Figura I7). Los receptores 5-HT<sub>1</sub> y 5-HT<sub>5</sub> están acoplados a proteínas G<sub>αi/0</sub>, que inhiben a la adenilato ciclasa (AC), disminuyendo la producción de adenosín monofosfato cíclico (AMPc). Por otro lado, los receptores 5-HT<sub>2</sub> están ligados a proteínas G<sub>αq</sub>, cuya activación activa a su vez a la PLC que hidroliza fosfoinosítidos de membrana resultando en la formación de diacilglicerol (DG) e IP<sub>3</sub>. IP<sub>3</sub> puede interaccionar con sus receptores en reservorios de Ca<sup>2+</sup>, elevando los niveles intracelulares y al igual que DG puede activar a la proteína quinasa C (PKC, del inglés *Protein Kinase C*). Los receptores 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub> y 5-HT<sub>7</sub> están ligados a proteínas G<sub>αs</sub> y su activación lleva a la estimulación de AC elevando AMPc, que actuando como segundo mensajero interacciona con canales iónicos y la proteína quinasa A (PKA, del inglés *Protein Kinase A*), entre otros. La estimulación de PKC y PKA deriva en activación de factores de transcripción que regulan la expresión génica (Berumen et al., 2012).

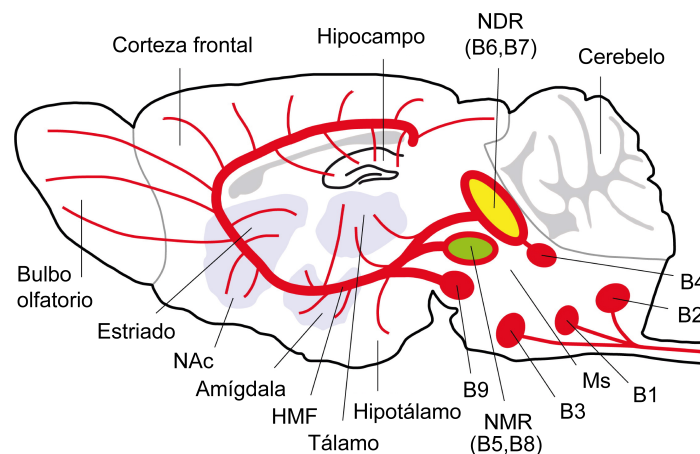


**Figura I7. Vías de señalización de los distintos tipos de receptores para 5-HT.** AC: adenilato ciclasa, AMPc: adenosín monofosfato cíclico, DG: diacilglicerol, Canal GIRK: del inglés *G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels* (canales rectificadores de potasio internos acoplados a proteínas G), IP<sub>3</sub>: Inositol 1,4,5-trifosfato, PKA: proteína quinasa A, PKC: proteína quinasa C, PLC: fosfolipasa C. Adaptado de Ohno et al., 2015.

Además de estos receptores serotoninérgicos es importante resaltar la existencia de transportadores para 5-HT (SERT, del inglés *Serotonin Transporter*). Los SERT pertenecen a la familia de transportadores dependientes de  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  y se encuentran localizados en la membrana plasmática de neuronas serotoninérgicas, y de otras células como plaquetas, células enterocromafinas (Lamiay et al., 2006), y astrocitos (Berumen et al., 2012). Estos transportadores juegan un papel clave en la neurotransmisión serotoninérgica, regulando los niveles de 5-HT extracelular mediante su recaptación (Ferrés-Coy et al., 2013).

## 2.1. Núcleo dorsal del rafe

En el cerebro de los mamíferos el sistema serotoninérgico se origina desde el rafe, que se extiende desde el mesencéfalo hasta el bulbo raquídeo a nivel rostro-caudal y se concentra en la línea media, donde las neuronas serotoninérgicas se distribuyen en 9 núcleos, numerados como B1-B9 tal y como se puede observar en la Figura I8 (Dahlström y Fuxe, 1964; Lesch y Waider, 2012).



**Figura I8. Sistema serotoninérgico del cerebro de ratón.** Representación de los núcleos del rafe (B1-B9), así como sus proyecciones hacia distintas áreas cerebrales. HMF: Haz medial frontal, MS: Mesencéfalo, NAc: Núcleo accumbens, NDR: Núcleo dorsal del rafe, NMR: Núcleo medial del rafe. Adaptado de Lesch y Waider, 2012.

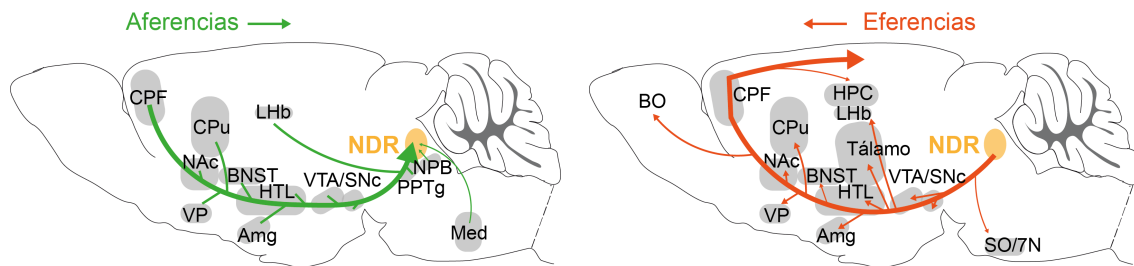
Los núcleos más caudales (B1-B3) proyectan hacia el tronco del encéfalo y la médula espinal, donde están involucrados en la actividad motora, el control del dolor y la regulación del sistema nervioso autónomo (Lesch y Waider, 2012). En cambio, los núcleos del rafe dorsales (B6, B7) y mediales (B5, B8) proyectan hacia diferentes regiones cerebrales rostrales al tronco encefálico de manera no exclusiva, interviniendo prácticamente todas las regiones (Lesch y Waider 2012), donde influyen en el procesamiento sensorial, la cognición, los estados emocionales, los ritmos circadianos, la ingesta de alimentos y la reproducción (Lesch y Waider 2012).

Dentro de los distintos núcleos, el NDR es la estructura serotoninérgica más grande en el cerebro (Michelsen et al., 2007) y es la responsable de la mayor proyección serotoninérgica ascendente hacia el cerebro anterior (Vertes 1991). Estas neuronas serotoninérgicas expresan



proteínas para la síntesis y recaptación de 5-HT (triptófano hidroxilasa (TPH) y SERT respectivamente) y su degradación enzimática corre a cargo de la monoaminooxidasa (MAO) (Wong et al., 2005). A nivel poblacional, las neuronas serotoninérgicas del NDR proyectan densamente a varias áreas del mesencéfalo y cerebro anterior donde están involucradas en funciones de recompensa, control afectivo e integración sensoriomotora. Estas áreas incluyen el área tegmental ventral (VTA)/sustancia negra pars compacta (SNc), el tálamo, el HTL, la amígdala (Amg), la CPF y el bulbo olfatorio (BO) (Vertes 1991; Liu et al., 2020). De manera menos densa, las neuronas serotoninérgicas, de la porción caudal e interfascicular del NDR, proyectan hacia el HPC y el septum medial (Vertes 1991; Liu et al., 2020). Además, las neuronas serotoninérgicas del NDR envían proyecciones descendentes hacia áreas del tronco encefálico que abarcan el núcleo parabraquial (NPB), la sustancia gris central pontina, la médula medial, el complejo olivar superior y el núcleo facial (SO/7N) (Liu et al., 2020) (Figura I9).

A su vez las neuronas serotoninérgicas del NDR reciben aferencias neuronales de múltiples estructuras del cerebro anterior y mesencéfalo implicadas en el control emocional, el procesamiento de recompensas, la homeostasis fisiológica y la toma de decisiones. Estas áreas de entrada incluyen la CPF, áreas del *pallidum*, Amg, LHb, HTL, VTA y NPB (Liu et al., 2020) (Figura I9).



**Figura I9. Principales aferencias y eferencias del NDR.** Amg: amígdala, BNST: núcleo del lecho de la estría terminal, BO: bulbo olfatorio, CPF: Corteza prefrontal, CPu: caudado putamen, HPC: hipocampo, HTL: hipotálamo, LHb: habénula lateral, Med: médula, NAc: núcleo accumbens, NDR: núcleo dorsal del rafe, NPB: núcleo parabraquial, PPTg: núcleo tegmental pedúnculo pontino, SNc: sustancia negra pars compacta, VP: pallidum ventral, VTA: área tegmental ventral. Adaptado de Liu et al., 2020.

Como se aprecia en la Figura I9, una gran densidad de fibras serotoninérgicas procedentes del NDR proyectan a CPF, siendo en concreto la CPFm el área que más fibras recibe y también la más rica en receptores serotoninérgicos (Celada et al., 2013; Chandler et al., 2013), lo que sugiere un importante rol del sistema serotoninérgico sobre el funcionamiento de la CPFm y el control del estado de ánimo, las emociones y los procesos cognitivos (Janet et al., 2023).

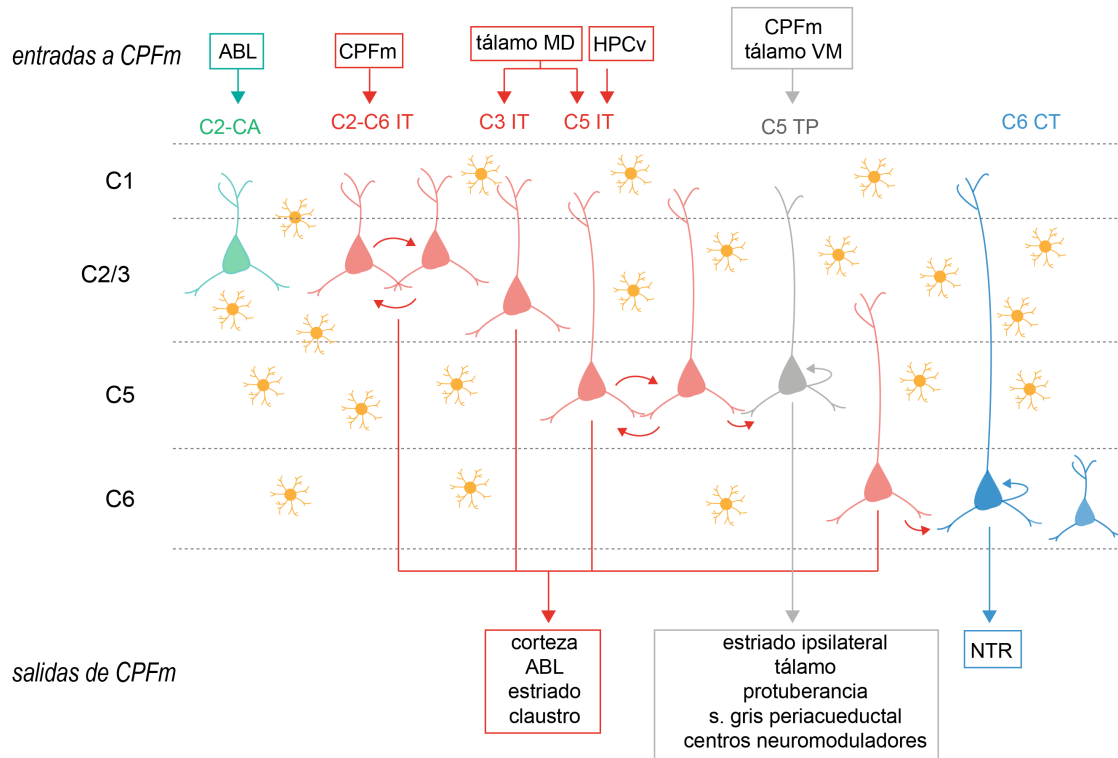
## 2.2. Neurotransmisión serotoninérgica en la CPFm

La CPFm, coordina funciones cerebrales superiores como son la cognición, la motivación, la recompensa y la emoción (Robbins y Arnsten, 2009). La CPFm corresponde a la porción más rostral del lóbulo frontal y se divide en el eje dorsoventral en tres subregiones: la corteza cingulada anterior (CCA), la corteza prelímbica (PL) y la corteza infralímbica (IL) (Anastasiades

y Carter, 2021). En roedores y primates la CPFm es agranular por lo que carece de capa (C) 4, presentando así cinco capas principales: C1, C2/3, C5 y C6. Las neuronas de proyección de la CPFm se localizan entre la C2 y C6, y participan en circuitos recíprocos con otras regiones cerebrales, involucrando células intratelencefálicas (**IT**), células del tracto piramidal (**TP**) y células corticotálámicas (**CT**), que a su vez se comunican entre ellas a través de una vía de excitación local (Brown y Hestrin, 2009; Collins et al., 2018; Ueta et al., 2019). Cada una de estas tres grandes poblaciones de **neuronas de proyección** (IT, TP y CT) se pueden subdividir a su vez en función del lugar al que proyectan, la ubicación dentro de las distintas capas de la corteza y su conectividad (Figura I10) (Anastasiades y Carter, 2021). Así, las **células IT** (Figura I10, rojo) están localizadas en las capas C2-C6 y desde allí proyectan a otras regiones de corteza, a la amígdala basolateral (ABL), al estriado y al claustró, formando así proyecciones cortico-corticales, cortico-amigdalares, cortico-estriatales y cortico-claustrales (Little y Carter, 2013; Sohur et al., 2014). Las **células TP** (Figura I10, gris) están confinadas a la C5 y desde allí proyectan hacia diversas regiones cerebrales subcorticales, incluyendo el estriado ipsilateral, el tálamo, la protuberancia, la sustancia gris periacueductal y múltiples centros neuromoduladores (Gabbott et al., 2005). Las **células CT** (Figura I10, azul), se localizan en la C6 y sus dendritas apicales se extienden hasta la superficie pial, lo que sugiere que reciben entradas sinápticas a lo largo de todas las capas. Además, estas neuronas también se dirigen al núcleo talámico reticular (NTR) ejerciendo una inhibición sobre el tálamo, lo que se ha relacionado con una regulación de la atención (Wimmer et al., 2015).

Además de estas proyecciones de la CPFm a otras regiones, también hay **aferencias** desde otras regiones cerebrales a CPFm, que incluyen otras áreas corticales, el tálamo, la ABL, el hipocampo ventral y el claustró y que regulan comportamientos relacionados con la cognición y la emoción (Spellman et al., 2015; Burgos-Robles et al., 2017; Schmitt et al., 2017). Cada una de estas aferencias sinápticas activa preferentemente tipos específicos de neuronas en la CPFm. De este modo, las aferencias desde la **CPF contralateral** (CPFc) se distribuyen en todas las capas y contactan con células IT en capas superficiales y profundas, (Little y Carter, 2013; Lee et al., 2014), neuronas cortico-amigdalares en C2 (Figura I10, verde) (Little y Carter, 2013) y células TP en C5 (Dembrow et al., 2015). Las entradas **talámicas** a la CPFm respaldan una amplia variedad de funciones cognitivas, incluyendo la memoria de trabajo, el aprendizaje, la atención y la vigilia (Parnaudeau et al., 2013; Schmitt et al., 2017; Honjoh et al., 2018). Se puede distinguir entre las entradas del tálamo mediodorsal (MD) y las entradas del tálamo ventromedial (VM). Las entradas del MD proyectan terminando en dos bandas prominentes de axones en C1 y C3, involucrando a las células IT de C3 y a las IT piramidales de C5. Por el contrario, las entradas de VM a la CPFm terminan en una banda densa en la C1 superficial, son relativamente débiles en las células IT de C2 a C5 y están altamente enriquecidas en las dendritas apicales distales de las células TP (Anastasiades y Carter, 2021). Las conexiones con la **ABL** (Figura I10, verde) son importantes para la codificación, expresión e inversión de estados emocionales, incluidos los recuerdos aversivos (Burgos-Robles et al., 2017; Bloodgood et al., 2018). Las entradas de la ABL están particularmente enriquecidas en C2 de la región PL, donde las neuronas cortico-amigdalares recíprocamente conectadas también son prominentes proporcionando la base

sináptica para un fuerte bucle recíproco (Little y Carter, 2013). Las entradas **hipocampales** a la CPFm proporcionan información contextual y juega un papel en la codificación mnemotécnica y el control emocional (Spellman et al., 2015; Sánchez-Bellot et al., 2022). Las entradas hipocampales provienen de células piramidales en el hipocampo ventral (HPCv), incluyendo tanto CA1 como el subículo y son específicas del tipo celular, dirigiéndose a las células IT en C5 (Liu y Carter, 2018).



**Figura I10. Esquema de los circuitos excitatorios en la CPFm.** Se muestran las células intratelencefálicas (IT, rojo), células del tracto piramidal (TP, gris), células corticotálamicas (CT, azul) y astrocitos (naranja) localizados en las distintas capas (C1-C6) de corteza prefrontal medial (CPFm). Se representan las principales aferencias (entradas a CPFm) y eferencias (salidas de CPFm) hacia/desde CPFm respectivamente, así como los circuitos excitatorios locales (flechas curvas). ABL: amígdala basolateral, CA: cortico-amigdal, HPCv: hipocampo ventral, NTR: núcleo talámico reticular, tálamo MD: tálamo mediodorsal, tálamo VD: tálamo ventromedial.

Además de estas entradas, otras proyecciones menos estudiadas son las procedentes de los núcleos del rafe. Las principales regiones del rafe que proyectan a CPFm son las subregiones rostrales y centrales del NDR. Desde allí, estas proyecciones inervan las distintas capas de la CPFm (Sargin et al., 2019), regulando el funcionamiento cognitivo y emocional (Russo y Nestler, 2013).

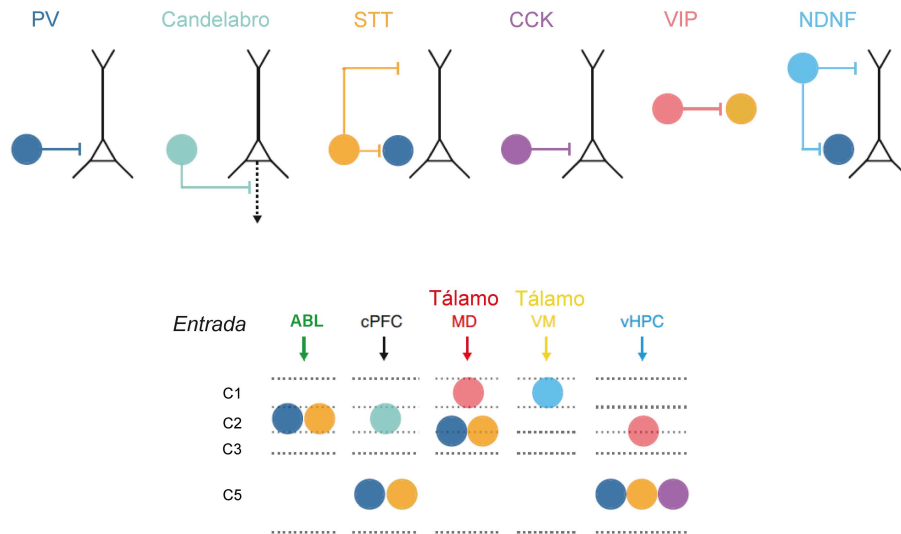
En el estudio de la conectividad de la CPFm, además de las proyecciones de entrada y salida a la CPFm hay que tener en cuenta la comunicación existente entre las neuronas de CPFm, mediante **circuitos locales excitatorios**. Las células piramidales se comunican de manera robusta tanto dentro de capas individuales como entre las distintas capas corticales (Figura I10)

(Anastasiades y Carter, 2021). Las conexiones entre los mismos tipos celulares son frecuentes en C2/3 amplificando así entradas sinápticas procedentes del tálamo MD o asegurando las proyecciones hacia las áreas subcorticales. En C5, las células TP reciben pocas entradas locales, procesando preferentemente aferencias de largo alcance, mientras que las células IT envían proyecciones ascendentes a C2/3 e inervan células TP, lo que podría asegurar que las computaciones locales se transmitan hacia las vías de salida desde CPFm. En C6, existen conexiones entre células IT y CT pero el conocimiento de las mismas y de cómo se pueden ver influidas por distintas aferencias es todavía limitado (Zolnik et al., 2020).

Por otro lado, es preciso considerar que estas proyecciones y circuitos locales están modulados a su vez por **interneuronas inhibitorias**, como se puede apreciar en la Figura I11. Estas interneuronas se dividen en tres grandes poblaciones, cada una de ellas con propiedades fisiológicas y morfológicas características: células inmunorreactivas para parvalbúmina (PV, que incluye a las células PV en cesto y a las células PV candelabro), somatostatina (STT), y para el receptor de 5-HT 3a (5-HT3a, que incluye las células que expresan colecistoquinina (CCK), el péptido intestinal vasoactivo (VIP), reelina, o el factor neurotrófico (NDNF)) (Tremblay et al., 2016). La diversidad de interneuronas inhibitorias en CPFm, junto con la variabilidad de las entradas sinápticas a esta región determinan el grado de inhibición sobre las células piramidales (Anastasiades y Carter, 2021).

Las células PV+ en cesto se localizan preferentemente entre C2-C6 y establecen conexiones rápidas e inhibitorias próximas al soma de las neuronas piramidales mientras, que las células PV+ candelabro predominan en el límite entre C1/2 y establecen sinapsis con el segmento inicial del axón de las neuronas piramidales. Por su parte, las células STT+ se encuentran entre C2-C5 e inhiben de manera preferente las dendritas de las neuronas piramidales. En cuanto a las células VIP+, se encuentran en C1-C2 y C5-C6 y contactan con otros tipos de interneuronas. Las células CCK+, por su parte se localizan a lo largo de todas las capas corticales e inhiben a nivel somático a las neuronas piramidales. Y, por último, las NDNF+ localizadas preferentemente en C1-C3 establecen sinapsis al nivel de las dendritas apicales distales en las células excitadoras (Figura I11) (Anastasiades y Carter, 2021).

En la CPFm las entradas excitadoras de larga proyección además de estimular neuronas piramidales también actúan sobre las interneuronas produciéndose un mecanismo conocido como *feedforward*, en el que se regula, de manera compleja, el grado de inhibición dentro del circuito. Las distintas entradas procedentes de CPFc, tálamo, ABL, HPCv y claustró activan fuertemente a las PV+ en cesto en distintas capas corticales (Anastasiades y Carter, 2021) (Figura I11). Asimismo, las entradas de CPFc también activan las células PV+ candelabro, que controlan preferentemente a las neuronas cortico-amigdalares de C2 para regular su salida (Lu et al., 2017). Otros ejemplos de esta inhibición *feedforward* lo representan las interneuronas CCK+, SST+ y 5-HT3a (Anastasiades y Carter, 2021).



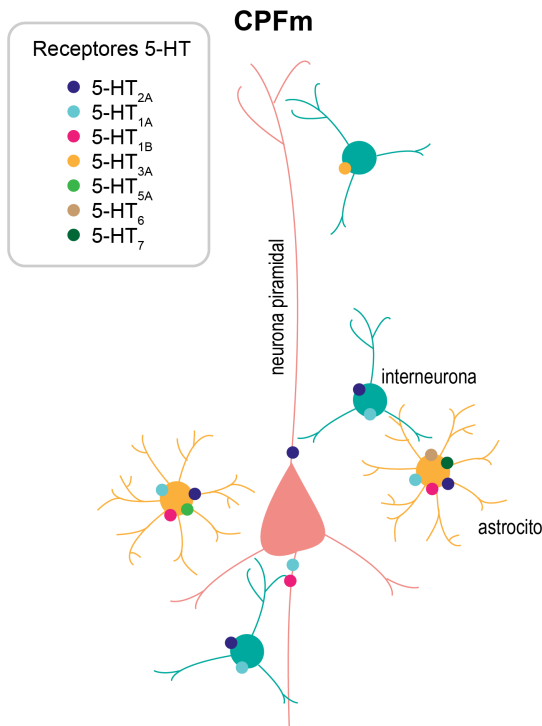
**Figura I11. Esquema de los circuitos inhibitorios en la CPFm.** Se muestran las conexiones inhibitorias locales y evocadas por entradas sinápticas a las distintas capas (C1-C5) de corteza prefrontal medial (CPFm). Células inhibitorias: parvalbúmina + en cesto (PV, azul oscuro), candelabro PV+ (verde), somatostatina + (STT, naranja), colecistoquinina + (CCK, violeta), que expresan el péptido intestinal vasoactivo + (VIP) y derivadas del factor neutrófico neuronal + (NDNF). ABL: amígdala basolateral, CA: cortico-amigdal, CC: cortico-cortical, HPCv: hipocampo ventral, IT: células intratelencefálica, tálamo MD: tálamo mediodorsal, tálamo VM: tálamo ventromedial, TP: células del tracto piramidal. Adaptado de Anastasiades y Carter, 2021.

Entre las distintas aferencias de larga proyección a CPFm cabe resaltar aquellas procedentes del tálamo MD, el HPCv y la ABL por su implicación en la regulación de comportamientos como la memoria de trabajo, la interacción social o la expresión de miedo (Yang et al., 2021). El tálamo MD inerva principalmente a las PV+ y la activación del circuito inhibitorio tálamo MD-CPFm es crucial para el desarrollo de la memoria de trabajo y la preferencia social (Brumback et al., 2018). Por su parte, el HPCv envía proyecciones de manera predominante a las PV+ y SST+ que regulan por separado distintos comportamientos complejos. Así, las SST+ podrían facilitar la sincronización de la actividad oscilatoria theta y gamma entre la CPFm y el HPCv durante el desarrollo de la memoria de trabajo espacial (Abbas et al., 2018), y las PV+ regularían la actividad de las aferencias del HPCv a la región IL de CPFm que participan en la extinción y recaída del miedo condicionado (Marek et al., 2018). Las proyecciones de la ABL inervan tanto PV+ como STT+ en CPFm, y la vía ABL-CPFm juega un papel esencial en la cognición social y la adquisición, expresión y extinción del miedo. Sin embargo, a pesar de estos estudios, los mecanismos específicos que involucran a las diferentes interneuronas GABAérgicas en comportamientos complejos no se conocen aún con claridad (Yang et al., 2021).

En última instancia, el impacto de una entrada a la CPFm va a depender de la compleja interacción entre las neuronas excitadoras, las interneuronas y las redes astrocitarias. Un objetivo a conseguir en el futuro es establecer cuál de estas respuestas domina en la actividad *in vivo*, y cómo estos diferentes elementos del circuito contribuyen a los comportamientos que involucran a la CPF.

Como se ha comentado, la CPFm recibe aferencias de distintas áreas cerebrales que incluyen

centros neuromoduladores. Así, en la CPFm se concentra una elevada densidad de axones serotoninérgicos procedentes de los núcleos dorsal y medial del rafe (Figuras I8, I9), sugiriendo un papel relevante de 5-HT en las funciones cognitivas y emocionales dependientes de la actividad de esta región (Celada et al., 2013). Estas entradas serotoninérgicas están moduladas por los múltiples receptores para 5-HT expresados a lo largo de sus capas y tipos celulares (Sargin et al., 2019), especialmente los subtipos 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>2C</sub> (Pazos y Palacios, 1985; Pazos et al., 1985).



Una vez liberada en los terminales sinápticos, 5-HT puede activar distintos receptores serotoninérgicos (Figura I12) causando diversos efectos a nivel de la transmisión sináptica. Los dos receptores más estudiados en CPFm son 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A</sub> que presentan una alta densidad de expresión en C5. El efecto global de 5-HT en las neuronas de CPFm es una hiperpolarización de sus membranas, mediada por la activación de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> (Araneda y Andrade, 1991; Béique et al., 2004), que están distribuidos con una alta densidad en las regiones somatodendríticas (Celada et al., 2013). Esta hiperpolarización está mediada por la activación de canales Kir3.x como consecuencia de la liberación de las subunidades G $\beta\gamma$  de las proteínas G heterotriméricas de la subfamilia G $\alpha_{i/o}$  (Andrade et al., 1986) (Figura I7).

**Figura I12. Localización de los receptores para 5-HT en CPFm.** Se muestra la expresión mayoritaria de los receptores de 5-HT en neuronas piramidales (rojo), interneuronas (verde) y astrocitos (naranja) de CPFm.

Los receptores 5-HT<sub>1A</sub> también participan en la modulación de la neurotransmisión glutamatergica excitatoria, ya que su activación suprime la señalización mediada por AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico) mediante la inhibición de CaMKII (calcio calmodulina cinasa II) (Cai et al., 2002) y reduce las corrientes mediadas por NMDA (N-metil-D-aspartato) en las neuronas de la CPF (Zhong et al., 2008b).

En muchos estudios realizados en CPF, la aplicación de 5-HT tras inducir una hiperpolarización desencadena una despolarización lenta en subpoblaciones neuronales (Araneda y Andrade, 1991; Villalobos et al., 2005). Esta despolarización está mediada por la activación de los receptores 5-HT<sub>2</sub> (siendo el subtipo 5-HT<sub>2A</sub> el más ampliamente expresado), que están localizados en los ejes dendríticos proximales de neuronas piramidales glutamatergicas y de manera más difusa en las espinas sinápticas en estrecha asociación con receptores de glutamato (Zhong et al., 2008b). La activación de los receptores 5-HT<sub>2</sub> inicia la cascada de señalización que facilita la formación de IP3 y DG que a su vez promueve la apertura de canales de Ca<sup>2+</sup> tipo L y por consiguiente la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde reservorios intracelulares



(Lesch y Waider, 2012) (Figura I7). La aparición de una hiperpolarización seguida de una despolarización, mediadas como se ha comentado por los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A</sub> respectivamente, puede deberse a una alta coexpresión de ambos receptores en las neuronas corticales (Araneda y Andrade, 1991; Amargós-Bosch et al., 2004; Béïque et al., 2004). Este hecho ha dado lugar a preguntarse por el sentido funcional de la aparición de una inhibición seguida de una excitación sináptica en las mismas neuronas corticales. Una posible explicación radicaría en la localización de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A</sub> en distintos compartimentos celulares. Así, estudios inmunohistoquímicos revelan una localización preferente de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> en el cono axónico, de las neuronas piramidales de CPF (DeFelipe et al., 2001), mientras que los receptores 5-HT<sub>2A</sub> se localizan predominante en las dendritas apicales y, en menor medida, en los somas de las neuronas piramidales de CPF (Martín-Ruiz et al., 2001). Esta segregación espacial sugiere que las aferencias serotoninérgicas pueden modular la ganancia de las entradas glutamatérgicas vía receptores 5-HT<sub>2A</sub> (Puig et al., 2003) y al mismo tiempo regular la probabilidad de generación de potenciales de acción a través de la activación de receptores 5-HT<sub>1A</sub> (Celada et al., 2013).

Además, también resulta necesario contemplar que 5-HT puede tener una acción selectiva sobre las distintas neuronas piramidales de CPFm activando vías de salida cortico-corticales, teniendo acciones mixtas en algunas vías de salida cortico-subcorticales e inhibiendo otras neuronas piramidales corticales, especialmente las neuronas cortico-pontinas (Celada et al., 2013). Adicionalmente, se ha propuesto que 5-HT puede tener un efecto bifásico, aumentando la actividad de disparo a dosis más bajas o disminuyéndola a dosis más altas (Avesar y Gullledge, 2012). Por otro lado, distintos estudios sugieren la existencia de una relación estrecha entre la actividad serotoninérgica mediada por 5-HT<sub>2A</sub> y la actividad glutamatérgica en CPFm, observándose un aumento muy marcado de la actividad sináptica excitatoria espontánea mediada por glutamato inducida por los receptores 5-HT<sub>2A</sub> (Lambe et al., 2000). Inicialmente, se pensaba que este efecto reflejaba la señalización retrógrada por los receptores 5-HT<sub>2A</sub> que conducía a la excitación de las aferencias talamocorticales (Lambe y Aghajanian, 2001). Sin embargo, investigaciones recientes sugieren que, si bien una gran fracción de las células piramidales de C5 expresa tanto receptores 5-HT<sub>1A</sub> como 5-HT<sub>2A</sub>, una subpoblación de células piramidales ubicadas en C5 profunda expresa únicamente receptores 5-HT<sub>2A</sub> (Béïque et al., 2007). Estas células serían fuertemente despolarizadas y excitadas por 5-HT y, dado que las células piramidales corticales están extensamente interconectadas (Figura I10), la excitación de esta segunda población de células piramidales en C5 probablemente contribuiría, al menos en parte, al aumento en la liberación de glutamato mediado por los receptores 5-HT<sub>2A</sub> (Béïque et al., 2007).

Por otra parte, hay que considerar que el efecto de 5-HT en CPFm puede ser más complejo teniendo en cuenta la expresión de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>3</sub> en interneuronas GABAérgicas (Puig et al., 2004; Santana et al., 2004; Lesch y Waider, 2012).

Asimismo, la mayoría de los estudios de neurotransmisión serotoninérgica en CPF se centran en la C5, existiendo por tanto un conocimiento limitado del efecto de 5-HT sobre las neuronas piramidales de otras capas de CPFm, como C2/3 (Goodfellow et al., 2009). En estas capas, como se ha descrito con anterioridad, abundan las proyecciones cortico-corticales ipsilaterales y contralaterales y trabajos recientes apuntan a que estas células expresan predominantemente

receptores 5-HT<sub>1A</sub> que inducen una hiperpolarización de las membranas neuronales (Goodfellow et al., 2009). Es preciso resaltar que C2/3 es la principal capa de procesamiento intracortical de la CPF y la última capa cortical en madurar (Clancy et al., 2001) y, en roedores, existe una maduración postnatal sustancial de su conectividad con áreas de corteza y amígdala (Bouwmeester et al., 2002). En conjunto, estos hechos hacen que la actividad neuronal de estas capas sea fundamental en la regulación del estrés durante las primeras etapas de la vida (Goodfellow et al., 2009) y en su modulación en un contexto de TD (Shrestha et al., 2015). Por ello, existe un creciente interés en comprender el funcionamiento de los circuitos neuronales de C2/3, y el impacto que tiene la señalización serotoninérgica sobre ellos.

### 2.2.1. Astrocitos y señalización serotoninérgica

Otro grado de complejidad a la señalización serotoninérgica en CPFm lo aportan los astrocitos, que también expresan receptores serotoninérgicos. Se ha descrito la expresión de los receptores 5-HT<sub>1A,1B,1D,1F</sub>, 5-HT<sub>2A-2C</sub>, 5-HT<sub>5A</sub>, 5-HT<sub>6</sub>, y 5-HT<sub>7</sub> en astrocitos localizados en distintas áreas cerebrales (Hirst et al., 1997, 1998; Berumen et al., 2012; Li et al., 2012). En concreto en CPFm los astrocitos expresan receptores: 5-HT<sub>2A,B,C</sub> que están acoplados a la vía de señalización intracelular IP3 induciendo una elevación de los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelulares (Sandén et al., 2000; Srinivasan et al., 2015) y activando la PKC en estas células (Berumen et al., 2012) (Figura I7). Los astrocitos también pueden expresar receptores 5-HT<sub>1A,1B,1D,1F</sub> (Hirst et al., 1998), 5-HT<sub>5A</sub> (Carson et al., 1996), 5-HT<sub>6</sub> (Hirst et al., 1997; Dupuy et al., 2023), y 5-HT<sub>7</sub> (Hirst et al., 1998). Sin embargo, el papel de estos receptores en astrocitos de CPFm ha sido menos estudiado y en ocasiones, su activación no comparte los efectos observados en neuronas; por ejemplo, la activación de los distintos subtipos de los receptores 5-HT<sub>1</sub> en astrocitos no está acoplada a la inhibición de la AC (Hirst et al., 1998). Sin embargo, la activación de los receptores 5-HT<sub>5A</sub> en astrocitos sí inhibe la AC (Carson et al., 1996). En cuanto a los receptores 5-HT<sub>7</sub> en astrocitos, se han relacionado con la liberación de factores neurotróficos o citoquinas inflamatorias (Mahé et al., 2004).

## 3. Trastorno depresivo (TD)

El trastorno depresivo (TD) es un trastorno psiquiátrico que se caracteriza por alteraciones cognitivas y psicosociales, que se traducen en una disminución en la interacción social y una alteración del procesamiento de información emocional (Uekermann et al., 2008) que viene acompañado de alteraciones en la atención, en las funciones ejecutivas y en procesos de aprendizaje y memoria (Beblo et al., 2011). Por todo ello, el TD es un problema público de salud mundial, según el Institute of Health Metrics and Evaluation (Global Health Data Exchange) el TD afecta a aproximadamente 280 millones de personas en el mundo, es la principal causa mundial de discapacidad y el suicidio es la cuarta causa de muerte (World Health Organization 2023). Se estima que para 2030, la depresión se convertirá en la principal



causa de enfermedad mundial (World Health Organization 2012). Así, esta enfermedad mental es grave, recurrente y potencialmente mortal (Goldberg y Nasrallah, 2022). Al mismo tiempo que supone un impacto socioeconómico muy grande (Murray et al., 2012) debido a su alta prevalencia (prevalece a lo largo de la vida en el 10-15% casos) (Kessler et al., 2003), a la aparición en períodos activos de la vida adulta y a que los tratamientos existentes son de acción lenta y eficacia limitada (Trivedi et al., 2006). Se estima que un tercio de los pacientes con TD no responden adecuadamente a los tratamientos antidepresivos convencionales (Artigas 2015), que estos tratamientos causan efectos adversos severos (Murrough et al., 2013a) y que el inicio de los efectos terapéuticos es lento, lo que restringe el uso de antidepresivos (Rush et al., 2006). Todo esto sugiere la necesidad de un conocimiento más profundo de la patofisiología de la depresión y el desarrollo de nuevos tratamientos.

Existen distintas teorías para abordar el estudio de una enfermedad tan compleja y multifactorial como esta (Filatova et al., 2021). Una de estas teorías propone al **estrés crónico** como uno de los factores principales relacionados con el TD (Nemeroff 1996; Filatova et al., 2021). En particular, se ha demostrado que eventos estresantes que tienen lugar durante la niñez y la adolescencia tienen un impacto crítico en la maduración del cerebro y están relacionados con una posterior inadaptación al comportamiento social y emocional y al desarrollo de desórdenes depresivos (Spear et al., 2000; Casey y Jones, 2010).

El estrés representa una respuesta necesaria para la supervivencia del individuo, en la que se prepara para la lucha o la huida (*fight or flight*, según el creador del término, Walter Cannon (Cannon 1929)), es decir, para superar la amenaza presente o para poder huir de ella. Para ello se desencadena en el organismo un conjunto de cambios fisiológicos que le preparan para detener el peligro y dirigir el balance energético hacia su afrontamiento. Sin embargo, a pesar de ser una reacción totalmente necesaria para la supervivencia, de sostenerse en el tiempo, puede acarrear consecuencias adversas para la salud y el bienestar.

El estrés estimula el eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) y la secreción de hormonas del estrés, como son el cortisol en humanos (Pearlmutter et al., 2020) y la corticosterona (Cort) en roedores (Pariante y Lightman, 2008). Estas hormonas actúan sobre los receptores para glucocorticoides (GR, del inglés *Glucocorticoid Receptors*) (Lu et al., 2022).

La respuesta al estrés se inicia con la activación de las neuronas del núcleo paraventricular (PVN, del inglés *Paraventricular Nucleus*) del hipotálamo, que liberan dos neurohormonas, la hormona liberadora de corticotropina (CRH, del inglés *Corticotropin Releasing Hormone*) y la arginina vasopresina (AVP), a los vasos sanguíneos que conectan el hipotálamo y la glándula pituitaria. Ambas hormonas estimulan la glándula pituitaria anterior para producir y segregar la hormona adrenocorticotropa (ACTH, del inglés *Adrenocorticotropic Hormone*) a la circulación general. La ACTH, a su vez, induce la síntesis y liberación de glucocorticoides desde las glándulas suprarrenales, que se encuentran en la parte superior de los riñones (Stephens y Wand, 2012).

La activación hipotalámica del eje HPA está modulada por diversos sistemas de señalización en el cerebro, unos tienen efectos inhibitorios (por ejemplo, GABA y opioides), mientras que otros tienen efectos excitatorios (por ejemplo, NA y 5-HT) sobre el PVN. Por lo tanto, el sistema

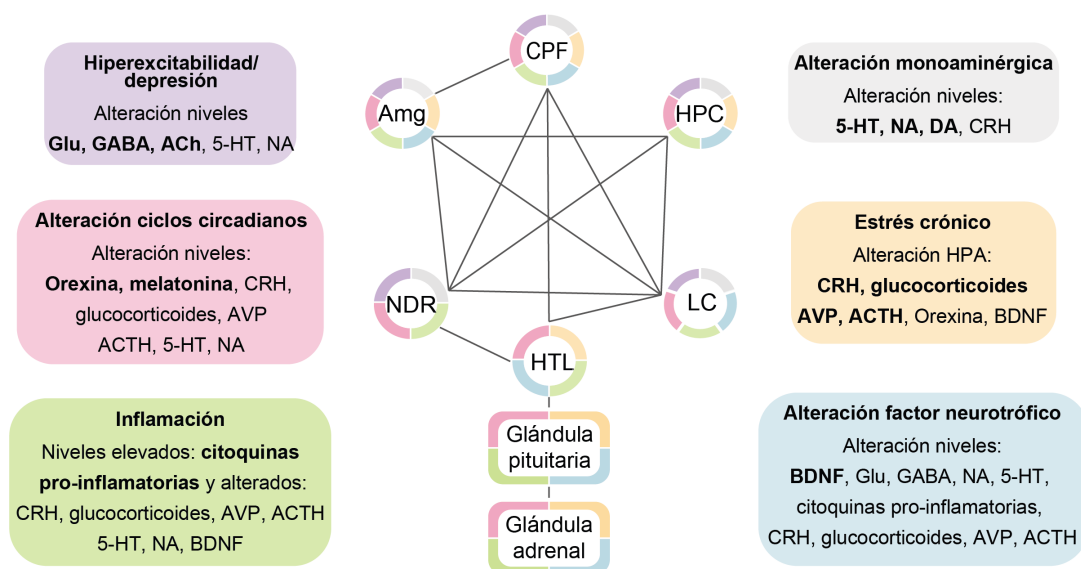
nervioso central y el sistema endocrino están estrechamente interconectados para coordinar la actividad glucocorticoide. Así, para evitar una activación prolongada, el eje HPA está cuidadosamente modulado a través de bucles de retroalimentación negativa diseñados para mantener los niveles hormonales predeterminados y la homeostasis (Stephens y Wand, 2012). En este sentido, la secreción de CRH, AVP y ACTH está controlada en parte por una retroalimentación negativa ejercida por el cortisol a nivel de la glándula pituitaria anterior, el PVN e hipocampo. En este mecanismo de retroalimentación negativa participan dos receptores para cortisol: los receptores para mineralocorticoides (MR, del inglés *Mineralocorticoid Receptors*) y los GR. El cortisol tiene una mayor afinidad por los MR que por los GR, lo que ayuda a mantener los niveles de cortisol que circulan en sangre relativamente bajos durante el ritmo diario normal. De esta manera, solo cuando la concentración de cortisol es alta, durante una situación estresante, se une a los GR desencadenando la respuesta al estrés (Stephens y Wand, 2012). Por tanto, este delicado mecanismo de control de retroalimentación negativa mantiene la secreción de ACTH y cortisol dentro de un margen relativamente estrecho, lo que es de extrema importancia porque una exposición excesiva a cortisol puede influir en el desarrollo de trastornos neuropsiquiátricos como el TD.

Por tanto, la activación crónica del eje HPA como consecuencia de un estrés prolongado lleva a alteraciones sostenidas en todos los órganos y sistemas afectados, dando lugar a una hipertrofia adrenal y una atrofia del timo asociada a una exposición prolongada a la corticotropina y al aumento de la hormona glucocorticoide, como se ha observado en estudios realizados en ratas (Prewitt y Herman, 1997). Además, la acción combinada del exceso de cortisol y agentes proinflamatorios podría ser deletérea tanto para neuronas como para células gliales (Filatova et al., 2021), pudiendo suprimir la neurogénesis y la plasticidad sináptica en la CPF y el hipocampo (Banasr y Duman, 2008; Otte et al., 2016), lo que, a su vez, podría resultar en una desregulación del metabolismo de neurotransmisores como glutamato (Auer et al., 2000) y GABA (Hamon y Blier, 2013), declive cognitivo (McEwen y Sapolsky, 1995), pérdida de apetito (Dallman et al., 2003), anhedonia (Russo y Nestler, 2013), tono cardiovascular alterado (Carney et al., 2005), entre otros síntomas (Filatova et al., 2021). Otra de las teorías, que ha sido durante décadas y sigue siendo de las más influyentes cuando se habla del TD, es la **hipótesis monoaminérgica**, que proporciona una justificación importante para el uso de antidepresivos.

Esta teoría monoaminérgica, formulada en la década de 1950 (Woolley y Shaw, 1954), expone que los síntomas depresivos se producen como resultado de niveles alterados de neurotransmisores monoaminérgicos como son: 5-HT (Ressler y Nemeroff, 2000), NA (Moret y Briley, 2011) y/o DA (Montgomery 2008). Sin embargo, hay muchos factores que esta teoría no contempla por lo que ha sido y es objeto de debate entre la comunidad científica. En esta línea, distintos estudios evidencian que una disminución en la síntesis de 5-HT, DA o ambos no conducía al desarrollo del TD en individuos sanos, por lo que podría ser necesaria una concentración de 5-HT superior a un umbral para que los inhibidores selectivos de la recaptación de 5-HT (SSRI, del inglés *Selective Serotonin Reuptake Inhibitors*) pudieran ser eficaces como antidepresivos. Por tanto, una disminución pronunciada de estos neurotransmisores monoaminérgicos no sería suficiente para causar el TD en individuos adultos sanos (Hamon y Blier, 2013; Filatova et al., 2021). Por ello, esta teoría no explicaría al completo

la etiología y la sintomatología del TD, ni tampoco la respuesta tardía a la terapia farmacológica y por qué los antidepresivos solo pueden lograr la remisión, pero no la recuperación completa (Filatova et al., 2021). Además, no hay evidencia clara de que un transmisor sea central para la etiología de la depresión. Numerosos datos sugieren que los neurotransmisores de monoaminas no son las únicas sustancias biológicamente activas involucradas en la etiopatogenia del TD (Villanueva 2013).

Además de la teoría del estrés o la desregulación de los sistemas monoaminérgicos, otras hipótesis postuladas para explicar la patogénesis del TD son la **hipótesis neurotrófica**, que se centra en una desregulación de los niveles del factor neurotrófico (BDNF, del inglés *Brain-Derived Neurotrophic Factor*) que podría inducir alteraciones en la neurogénesis y en la plasticidad neuronal (Kojima et al., 2019); la **hipótesis inflamatoria**, en la que el sistema inmunológico y niveles elevados de citoquinas proinflamatorias podrían estar involucradas en el desarrollo del TD (Liu et al., 2017; Westfall et al., 2021); la **hipótesis circadiana**, que propone una correlación entre la alteración de los ciclos circadianos y el TD (Edgar y Mcclung, 2013); y la **hipótesis de la hiperexcitabilidad glutamatérgica y colinérgica** junto con la **depresión GABAérgica**, que inducen una alteración de la plasticidad sináptica (Drevets et al., 2008; Pehrson y Sanchez, 2015). Teniendo en cuenta todo esto, el TD se presenta como una enfermedad heterogénea, en la que distintas estructuras cerebrales, neurotransmisores y hormonas estarían involucradas, tal y como se muestra en la Figura I13. De este modo, es posible que existan múltiples subtipos de esta enfermedad con perfiles bioquímicos diferentes, lo que podría explicar la gran variabilidad de respuestas a los distintos tratamientos antidepresivos.



**Figura I13. Esquema de las principales hipótesis sobre la etiopatogénesis del TD.** Se muestran las principales áreas cerebrales y glándulas involucradas, así como las interacciones entre ellas (línea gris). Los distintos colores que rodean a cada estructura cerebral indican su implicación en las distintas hipótesis sobre la etiología del TD. Nótese que existe una interconexión entre los elementos que aparecen alterados en cada una de las hipótesis planteadas. 5-HT: 5-hidroxitriptamina, ACh: acetilcolina, ACTH: hormona adrenocorticotrópica, AVP: arginina-vasopresina, BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro, CPF: corteza prefrontal, CRH: hormona liberadora de

corticotropina, DA: dopamina, GABA: ácido gamma-aminobutírico, Glu: glutamato, HPA: eje hipotálamo-pituitario-adrenal, NA: noradrenalina.

### 3.1. Modelos murinos para el estudio del TD

A pesar de los muchos avances en el estudio del TD, la etiología de dicha enfermedad no se comprende de manera completa lo que hace que su estudio en roedores sea de gran utilidad y, al mismo tiempo un gran reto. Es preciso considerar que hay síntomas del TD, como la culpa, el suicidio o la tristeza que son probablemente características puramente humanas (Krishnan y Nestler, 2011). Sin embargo, existen otros aspectos de esta enfermedad, como la anhedonia, la desesperanza, la impotencia, las alteraciones del sueño y del apetito, entre otros, que sí se han podido reproducir en animales de laboratorio, siendo estos modelos animales clave para mejorar los tratamientos antidepresivos (Krishnan y Nestler, 2011). Desde una perspectiva evolutiva, la depresión podría ser un análogo de la estrategia de derrota involuntaria (IDS, del inglés *Involuntary Defeat Strategy*) en los animales, que se desencadena cuando un animal percibe una derrota en una lucha jerárquica por los recursos (Sloman 2008).

Actualmente, existen distintos modelos animales validados para el estudio del TD en roedores. Una manera de poder validar dichos modelos es siguiendo el sistema *Research Domain Criteria* (RDoC), el cual contempla que, dado que la investigación de enfermedades psiquiátricas puede proveernos únicamente de una información parcial, es preciso abandonar un enfoque nosológico y estudiar endofenotipos específicos de dichas enfermedades. Este enfoque basado en los endofenotipos podría superar las inconsistencias existentes en la reproducibilidad entre los distintos modelos animales, centrándose en los comportamientos relacionados con la enfermedad (Anderzhanova et al., 2017). Este sistema propone categorizar los estados patológicos en función de la alteración de 5 dominios comportamentales: (1) sistemas de valencia positivos (capacidad de respuesta y aprendizaje ante recompensas, motivación, placer, apego) (2) sistemas de valencia negativos (miedo, ansiedad, frustración, pérdida, falta de recompensas) (3) sistemas regulatorios y de excitación (estado de alerta, ritmos circadianos, sueño) (4) sistemas de procesos sociales (percepción, comunicación social, vinculación afectiva) (5) sistemas cognitivos (atención, control cognitivo, memoria de trabajo, percepción).

Los distintos modelos animales que existen para el estudio del TD, podrían clasificarse en tres grandes grupos: los modelos basados en un estrés agudo (test de natación forzada, test de suspensión de cola, modelo de indefensión aprendida), los modelos de depresión secundaria o iatrogénica (alteración del eje hipotálamo-pituitario-adrenal, administración crónica de glucocorticoides, administración de derivados del ácido retinoico, alteración del sistema inmunitario) y los modelos de estrés crónico (modelo del estrés crónico leve, CMS, del inglés *Chronic Mild Stress*; modelos de estrés psicosocial) (Krishnan y Nestler, 2011).

En esta tesis doctoral, se ha utilizado un modelo de depresión secundaria, basada en la administración crónica de Cort (ver apartado 2.1. Material y Métodos). Este modelo recapitula la mayor parte de los endofenotipos relacionados con el TD, según el sistema RDoC, comentado anteriormente, como son un aumento de los comportamientos con valencia negativa (Gourley y Taylor, 2009; Ferrés-Coy et al., 2015), una pérdida de los comportamientos con valencia positiva

(Ferrés-Coy et al., 2015; Dieterich et al., 2019) y una alteración de las habilidades cognitivas y sociales (Lui et al., 2017; Zhao et al., 2022). Además, este modelo presenta otras ventajas como son la reproducibilidad (administración de Cort en el agua de bebida, control de la dosis), la inducción de un efecto persistente (la sintomatología perdura finalizado el período de exposición a Cort), y la posibilidad de revertir los efectos mediante el tratamiento crónico con antidepresivos (fluoxetina, amitriptilina) (Gourley y Taylor, 2009).

### 3.2. Disfunción del sistema serotoninérgico y el TD

Muchos de los estudios que tratan de comprender la disfunción del sistema serotoninérgico en el TD, se centran en la CPFm por ser el área con mayor inervación serotoninérgica desde el NDR y la más rica en receptores serotoninérgicos (Celada et al., 2013; Chandler et al., 2013), además de un centro crítico para el control de la función ejecutiva y la regulación emocional, y también una diana para las hormonas del estrés (Bittar y Labonté, 2021; Janet et al., 2023).

La CPF va a regular la actividad de los distintos sistemas monoaminérgicos ascendentes, enviando aferencias a las áreas donde se localizan los somas de neuronas serotoninérgicas, noradrenérgicas y dopaminérgicas (Groenewegen y Uylings, 2000; Martín-Ruiz et al., 2001; Gabbott et al., 2005). Por ello, cambios metabólicos en regiones concretas de la CPF, como la corteza cingulada anterior en humanos (equivale a la corteza infralímbica en roedores) pueden alterar las relaciones funcionales entre las áreas corticales y las áreas límbicas. Por tanto, estos cambios metabólicos, pueden inducir una alteración en la actividad de la CPF que puede traducirse en una hipoactividad funcional de los sistemas monoaminérgicos y contribuir al desarrollo del TD (Seminowicz et al., 2004). El estrés crónico puede inducir una atrofia y una pérdida de espinas dendríticas en las neuronas de CPF como se ha constatado en distintos modelos animales de estrés crónico (Cook y Wellman, 2004; Radley et al., 2008), así como en tejido post mortem humano (Rajkowska et al., 2005; Ressler y Mayberg, 2007). En línea con el papel crucial de la CPF en el TD, se ha observado que la estimulación profunda del cerebro en áreas concretas dentro de la CPF induce una notable mejoría de los síntomas de esta enfermedad en algunos pacientes deprimidos, respaldando un papel clave de la hipo/hiperactividad existente en diferentes regiones de la CPF durante el TD (Ressler y Mayberg, 2007; Holtzheimer y Mayberg, 2011). Además, estos efectos beneficiosos de la estimulación profunda en modelos animales de depresión dependen de 5-HT, lo que indica un papel primordial de la relación entre 5-HT-CPF en el tratamiento efectivo de la depresión (Hamani et al., 2012).

Por todo esto, un amplio abanico de fármacos antidepresivos se ha focalizado en restaurar el sistema monoaminérgico en áreas corticales y límbicas, mejorando así los síntomas depresivos (Artigas 2015). En concreto, diversos estudios clínicos muestran que la eficacia de los fármacos antidepresivos depende de la función serotoninérgica (Artigas 2013). Ejemplos de su implicación en el TD son, por un lado, la existencia de concentraciones reducidas de ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), el principal metabolito de 5-HT, en el líquido cefalorraquídeo de pacientes deprimidos (Åsberg et al., 1976; Roy et al., 1989), así como concentraciones reducidas de 5-HT y 5-HIAA en tejido cerebral post mortem de pacientes deprimidos y/o víctimas de suicidio (Artigas 2013). Aunque sin duda, una de las mayores evidencias recae en la eficacia de los antidepresivos dirigidos a SERT, como son los SSRI y los inhibidores de la recaptación de 5-



HT y NA (SNRI, del inglés *Serotonin and Noradrenaline Reuptake Inhibitors*), que representan más del 90% del mercado global de antidepresivos desde 1990 (Artigas 2015; Moncrieff et al., 2022), y presentan como efecto común el aumento de la disponibilidad de 5-HT en la hendidura sináptica (Moncrieff et al., 2022).

Además, la acción de estos SSRI está estrechamente ligada a la actividad de los distintos receptores para 5-HT (Marek et al., 2003; Yohn et al., 2017). Por tanto, estos receptores son también dianas terapéuticas sobre las que los agentes antidepresivos pueden actuar. Entre ellos destacan los receptores 5-HT<sub>1A,1B</sub> por su importante actuación en la señalización serotoninérgica realizando, entre otras funciones, un autocontrol de la misma. Esto es debido a la localización estratégica de los auto-receptores 5-HT<sub>1A,1B</sub> en el NDR, que mediante su activación reducen la tasa de disparo de las neuronas serotoninérgicas, induciendo una reducción generalizada de la liberación de 5-HT en la mayoría del cerebro, manteniendo de esta manera la homeostasis del sistema. Sin embargo, esta acción va en detrimento del funcionamiento de los antidepresivos SSRI, cuya acción se centra en aumentar los niveles de 5-HT, ya que activarían los receptores 5-HT<sub>1A,1B</sub> induciendo una disminución del disparo de las neuronas serotoninérgicas. Sin embargo, un tratamiento prolongado con SSRI ejercería el efecto inverso, debido a la desensibilización de ambos receptores en los núcleos del rafe (Hervás et al., 2001). Esto podría explicar la alta latencia de la acción clínica de los tratamientos antidepresivos (Artigas 2013). De esta manera se ha propuesto la utilización tanto de agonistas de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> en altas dosis, como la combinación de antagonistas de 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>1B</sub> como agentes antidepresivos, aumentando los efectos comportamentales y neuroquímicos ejercidos por los SSRIs (Gobert et al., 1997).

Por otro lado, se ha prestado un especial interés a los receptores 5-HT<sub>2A</sub> en el TD, por su vinculación preferente con la regulación de estados emocionales en diversas regiones cerebrales como la amígdala, el hipocampo, el tálamo, el *locus coeruleus* y varias áreas corticales (Guiard y Giovanni 2015). En concreto, en CPF existe una expresión notable de estos receptores (de Almeida y Mengod 2007), poniendo en relieve su importante papel en la regulación de la actividad neuronal de esta región cerebral y también de las vías descendentes (Yan y Rein 2021). Asimismo, se ha relacionado la presencia de estos receptores con el TD (Carhart-Harris y Nutt 2017), observándose una mayor expresión del mismo en tejido post mortem de víctimas de suicidio (Pandey et al., 2002; Underwood et al., 2018). Estudios preclínicos han demostrado que los antagonistas de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> tienen propiedades antipsicóticas y antidepresivas, mientras que los agonistas poseen propiedades cognitivas y alucinógenas (Carhart-Harris y Nutt 2017). Asimismo, se ha observado que los fármacos antipsicóticos antagonistas de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> (como la risperidona y la olanzapina) potencian la eficacia antidepresiva de los SSRIs en el TD resistente en humanos (Shelton et al., 2001) y producen efectos beneficiosos en modelos animales de depresión (Pandey et al., 2010). Por todo ello, se considera a los receptores 5-HT<sub>2A</sub> como una posible diana en el estudio y tratamiento del TD. Además, hay que tener en cuenta que especialmente en la CPFm hay una alta coexpresión de receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A</sub> (Amargós-Bosch et al., 2004), por lo que el bloqueo de los 5-HT<sub>2A</sub> aumentaría la neurotransmisión mediada por los 5-HT<sub>1A</sub>, alterando el control de la CPF sobre las redes cortico-límbicas, pudiendo inducir un aumento de la eficacia antidepresiva de los SSRI (Amargós-Bosch et al., 2004; Artigas 2013).

Además del sistema serotoninérgico, existen otros sistemas involucrados en el TD. Especial mención requiere el sistema glutamatérgico en la patofisiología de esta enfermedad. Numerosos estudios post mortem vinculan anomalías en las células gliales, por su papel en la eliminación sináptica del glutamato, con la fisiopatología de los trastornos del estado de ánimo (Kugaya y Sanacora 2005). Entre ellas destacan niveles bajos de glutamina/glutamato en la corteza de pacientes con depresión (Yildiz-Yesiloglu y Ankerst 2006). Además, el creciente uso de la ketamina (antagonista de los receptores NMDA), como antidepresivo de acción rápida refuerza aún más el papel del glutamato en pacientes con TD resistentes al tratamiento (Murrough et al., 2013b). En esta línea, se ha demostrado que los receptores NMDA, AMPA, kainato y metabotrópicos de glutamato (mGluR) son responsables de modular el estado de ánimo y las funciones asociadas que están afectadas en el TD (Millan 2005). Estas observaciones respaldan el estudio de la transmisión glutamatérgica para el desarrollo de nuevos medicamentos antidepresivos (Artigas 2015; Khoodoruth et al., 2022).

### 3.3. Implicación de los astrocitos en el TD

El TD fue estudiado inicialmente como una enfermedad neuropsiquiátrica, en la que la causa principal involucraba a las neuronas (Manji et al., 2001). Sin embargo, evidencias recogidas durante las dos últimas décadas han puesto de manifiesto la relevancia de las células de glía, y en particular de los astrocitos, tanto en la patofisiología como en la patogénesis del TD (Rajkowska y Stockmeier 2013; Cao et al., 2013; Koyama 2015). Este hecho no es sorprendente teniendo en cuenta la participación de los astrocitos en una gran variedad de funciones en el sistema nervioso central, desde la captación de transmisores, al tamponamiento iónico, el soporte metabólico, la producción del factor neurotrófico o la modulación de la transmisión y plasticidad sináptica y de los circuitos neuronales, entre otras (Verkhratsky y Butt 2013; Verkhratsky y Nedergaard 2018). Además, los astrocitos expresan receptores para glucocorticoides (Zhang et al., 2014), por lo que son muy sensibles a los factores estresantes del cerebro, siendo diana de las acciones mediadas por Cort/cortisol y experimentando como consecuencia cambios en su estructura y función. Todo ello enfatiza su rol en las enfermedades psiquiátricas (Rajkowska y Stockmeier, 2013; O'Leary y Mechawar, 2021).

Estudios post mortem de pacientes que padecían TD, así como personas fallecidas por suicidio han revelado la existencia de alteraciones tanto en el número como en la morfología de los astrocitos (Miguel-Hidalgo et al., 2000; Torres-Platas et al., 2011; Nagy et al., 2015). Así, el número y densidad de los astrocitos se ha visto reducido en distintas áreas cerebrales como la CPF, la corteza cingulada anterior, el hipocampo y la amígdala. Este hecho, se ha constatado mediante la observación de una reducción de los niveles de expresión de marcadores astrocitarios como la proteína ácida fibrilar glial (del inglés *Glial fibrillary acidic protein*, GFAP) (Miguel-Hidalgo et al., 2000; Nagy et al., 2015) y alteraciones en los niveles de la proteína de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ , S100 $\beta$  en el suero de pacientes con TD (Arora et al., 2019). Además, la reducción experimental de la densidad de astrocitos en la CPFm realizada en modelos animales induce un fenotipo depresivo (Banasr y Duman 2008).

Asimismo, la alteración en la densidad de astrocitos va generalmente acompañada de cambios en la morfología de los astrocitos en pacientes que padecían TD. En este aspecto existen discrepancias, en función del área (CPFm, hipocampo, amígdala) y del origen del tejido estudiado (pacientes depresivos, modelos animales de depresión) encontrándose en algunos estudios una atrofia astrocitaria, que se refleja en una reducción del tamaño del soma y de los procesos astrocitarios (Davis et al., 2002; Miguel-Hidalgo et al., 2010; O'Leary y Mechawar, 2021; Lin et al., 2023), y en otros una hipertrofia astrocitaria con un aumento del soma y del número y longitud de procesos (Torres-Platas et al., 2011; Murphy-Royal et al., 2020).

Tal es la relevancia funcional de los astrocitos en la fisiología cerebral que las alteraciones farmacológicas para modificar su función, en distintos modelos roedores, puede inducir comportamientos asociados al TD (John et al., 2012; Rial et al., 2016; Fullana et al., 2019b; Shigetomi y Koizumi 2023). Un ejemplo de ello es la asociación entre la alteración de la señalización glutamatérgica y el TD (Sanacora et al., 2012; Bender et al., 2016; Fullana et al., 2019a). En esta señalización los astrocitos juegan un papel fundamental, mediante la recaptura de este neurotransmisor en la hendidura sináptica, a través de los transportadores GLT-1/EAAT2 (del inglés, *Glutamate Transporter 1* y *Excitatory Amino Acid Transporter 2*) y GLAST/EAAT-1 (del inglés *Glutamate-Aspartate Transporter* y *Excitatory Amino Acid Transporter 1*) (Fullana et al., 2019a). Por tanto, una alteración de esta función supone un aumento de los niveles de glutamato en la hendidura sináptica, lo que a su vez modifica la transmisión sináptica y la excitabilidad neuronal, e induce estados depresivos que se manifiestan con un aumento de la desesperanza y la anhedonia (John et al., 2012; Fullana et al., 2019b).

Estudios post mortem en pacientes diagnosticados con TD han permitido la observación de una disminución de varios componentes del ciclo glutamato-glutamina, como GLT-1, GLAST, glutamina sintetasa en la región fronto-límbica (Choudary et al., 2005; Sanacora y Banasr 2013) y estudios de neuroimagen con espectroscopía de resonancia magnética con protones en pacientes que sufren TD han revelado una disminución de los niveles de glutamato y glutamina en distintas regiones como la CPF (Portella et al., 2011). De manera consistente con estos resultados, distintos estudios han comprobado que la inhibición de los transportadores GLT-1 y/o GLAST en astrocitos de regiones específicas de CPF en modelos animales induce un fenotipo depresivo (John et al., 2012; Fullana et al., 2019b). Este efecto global inducido por una alteración de las redes de astrocitos locales de CPF podría explicarse considerando las proyecciones descendentes de esta área hacia los núcleos del rafe, porque la hiperexcitabilidad inducida en CPF podría desencadenar una atenuación de la función serotoninérgica (Fullana et al., 2019b).

Otro aspecto a considerar es la capacidad de los astrocitos para modular la plasticidad sináptica mediante la liberación de gliotransmisores. Un estudio realizado por Cao y colaboradores en 2013 (Cao et al., 2013) puso de manifiesto que distintos modelos de TD en roedores exhibían una reducción en sus niveles de ATP, y que un aumento de la actividad purinérgica promovida por astrocitos era suficiente para inducir un efecto antidepresivo, a través de los receptores P2X2. Además, mostraron que deficiencias en la liberación de ATP por parte de los astrocitos, en ratones *lp3r2<sup>-/-</sup>* o ratones transgénicos que presentan un bloqueo de la gliotransmisión vesicular, suponía la aparición de comportamientos relacionados con el TD, que podían revertirse mediante la administración de ATP (Cao et al., 2013). Asimismo, otros



gliotransmisores se han relacionados con el TD, como: Ado, por su efecto antidepresivo inducido por la privación del sueño o por la estimulación profunda de la CPF infralímbica (Hines et al., 2013; Etiévant et al., 2015); y D-serina, que mediante un aumento de su liberación por parte de los astrocitos es capaz de reducir comportamientos relacionados con la desesperanza (Otte et al., 2013).

Los astrocitos también se han relacionado con el TD por alteraciones en su capacidad de comunicación intercelular a través de uniones tipo GAP. Estudios realizados en tejido post mortem de pacientes con TD y en modelos animales de depresión muestran una disminución de los niveles de proteínas Cx43 y Cx30 en la CPF (Ernst et al., 2011; Sun et al., 2012), las dos subunidades predominantes en las uniones tipo GAP de los astrocitos (Giaume y McCarthy 1996).

Una de las funciones cruciales de los astrocitos en la fisiología del sistema nervioso central es la de reservorio y soporte metabólico. Existe una relación metabólica recíproca entre astrocitos y neuronas, en la que los astrocitos pueden captar glucosa de los capilares sanguíneos, que posteriormente pueden liberar o metabolizar mediante la glicolisis para producir ATP y lactato, que puede actuar como sustrato energético y modular la transmisión y la plasticidad sinápticas (Wang et al., 2017; Magistretti y Allaman 2018). El estrés puede reducir la expresión de las conexinas Cx43 y Cx30, lo que altera el transporte de lactato desde astrocitos a neuronas deteriorando con ello la plasticidad sináptica (Wang et al., 2017; Murphy-Royal et al., 2020). Además, en pacientes afectados por el TD se detectó una alteración en el metabolismo de la glucosa, mediante una hipoactividad de la CPF detectada con resonancia magnética funcional (Kimbrell et al., 2002), una disminución en la conexión entre los procesos astrocitarios y los vasos sanguíneos (Rajkowska et al., 2013) y una disminución en los niveles del nucleósido trifosfato derivado de ATP (Moore et al., 2006). Por todo ello, un aumento en el suministro de energía en el cerebro mejora los síntomas de pacientes con TD (Yoon et al., 2016).

En línea con la teoría de la inflamación crónica, se ha mostrado cómo la activación de los astrocitos participa en los procesos inflamatorios mediante la producción y liberación de citoquinas y su interacción con la microglía (Vainchtein y Molofsky 2020). Se ha observado como en pacientes con TD los niveles de muchos marcadores de inflamación como son Interferon- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 y TNF $\alpha$ , entre otros, se encontraban aumentados en vesículas extracelulares que derivan de astrocitos (Xie et al., 2022).

Todos estos resultados sugieren que los astrocitos desempeñan un papel importante en la patofisiología y patogénesis del TD. Sin embargo, los mecanismos pueden ser muy variados, incluyendo vías moleculares distintas. Esto abre la posibilidad del estudio y desarrollo de nuevas dianas para tratamientos antidepresivos (Czéh y Di Benedetto 2013), con el fin de discernir si todas las alteraciones descritas en los astrocitos juegan el mismo papel en el TD, si puede existir una interrelación entre ellas, cómo afectan a la comunicación astrocito-neurona, y si como plantean Wang y colaboradores existe una secuencia temporal entre los déficits señalados, es decir si ocurren en paralelo o si diferentes alteraciones en los astrocitos convergen para provocar la depresión en diferentes individuos (Wang et al., 2017).

En este contexto, un aspecto menos explorado es cómo afecta el TD a la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos, un regulador intracelular clave en la fisiología de estas células, tanto en reposo como en respuesta a las demandas neuronales.

Por todo ello, esta tesis doctoral se ha centrado en investigar el papel de las dinámicas de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos y su acción sobre la señalización serotoninérgica astrocito-neurona, en un modelo de estrés crónico en ratón que recapitula comportamientos similares a los depresivos.



# - CAPÍTULO II - HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---



## II. Hipótesis y objetivos

El objetivo de la presente tesis doctoral ha sido el estudio de las propiedades de la comunicación bidireccional entre neuronas y astrocitos en la corteza prefrontal medial (CPFm) y su relación con el sistema serotoninérgico en condiciones fisiológicas y patológicas, como el trastorno depresivo (TD).

Para lograr este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Análisis morfológico de los astrocitos de CPFm en condiciones control y en el TD.
2. Caracterización de las propiedades de la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos de CPFm espontánea e inducida por 5-HT en condiciones control y en el TD.
3. Estudio del efecto de la gliotransmisión evocada por 5-HT sobre la excitabilidad de neuronas piramidales de la capa 2/3 de CPFm en condiciones control y en el TD.
4. Análisis del impacto de la señalización serotoninérgica sobre la plasticidad sináptica excitadora en neuronas de la capa 2/3 de CPFm en condiciones control y en el TD.
5. Evaluación de las consecuencias de la manipulación selectiva de los astrocitos de CPFm en el comportamiento animal.





# - CAPÍTULO III - MATERIALES Y MÉTODOS

---





## III. Materiales y métodos

### 1. Declaración ética

Todos los procedimientos para el manejo y sacrificio de los animales siguieron las guías de la Comisión Europea para el bienestar de los animales de experimentación (2010/63/EU) y fueron aprobados por el Comité de Bioética del Instituto Cajal (2013/53/RD) y la Comunidad de Madrid (Proex 032/17; Proex 306-1-21). Se tomaron todas las medidas y esfuerzos necesarios cumpliendo las 3R's para minimizar el número y sufrimiento de los animales de experimentación.

### 2. Animales de experimentación animal

En la presente tesis doctoral se utilizaron ratones macho C57BL/6, *Ip3r2<sup>-/-</sup>*, *Aldh1l1*-eGFP y *htr2a<sup>-/-</sup>* de 1 a 5 meses de edad. Además, para los estudios comportamentales en los que se analizó el efecto de Gq-DREADDs en astrocitos de CPFm en el modelo de Cort se utilizaron hembras C57BL/6 en un rango de edad de 1 a 3 meses.

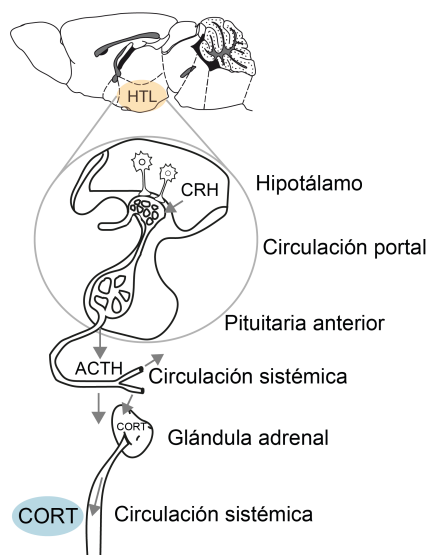
Los animales se mantuvieron estabulados en condiciones estándar en el animalario del Instituto Cajal bajo un ciclo de 12 horas día/noche y en habitaciones con temperatura controlada.

Los registros *ex vivo* e *in vivo*, así como las tareas comportamentales se realizaron en animales de 1 a 3 meses de edad. Los estudios longitudinales para el análisis de los efectos de la Cort a largo plazo en el test de natación forzada se realizaron en animales de 2 a 5 meses de edad.

#### 2.1. Modelo murino de TD

El tratamiento crónico con Cort se ha utilizado como un modelo farmacológico para inducir estados de depresión en roedores (Gourley y Taylor, 2009; Ferrés-Coy et al., 2015; Berger et al., 2019; Dieterich et al., 2019; Lin et al., 2022). Este modelo reproduce algunas de las principales características de la enfermedad humana en roedores. La Cort es la principal hormona secretada en roedores en respuesta al estrés (Pariante y Lightman, 2008). Su secreción es inducida por la activación del eje HPA (Figura M1).

La Cort (# C2505; Sigma-Aldrich) se disolvió en agua mineral y se administró por vía oral, en ratones p30, durante 28 días. Para facilitar su disolución se incrementó el pH a 12-13 utilizando NaOH 10 M y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente (TA) hasta su total disolución (7-8 h). Se neutralizó el pH a 7-7,4 utilizando HCl. El tratamiento se basa en la administración de concentraciones decrecientes de Cort; de esta manera, se inició el tratamiento con una concentración de 30 µg/ml (resultando en una dosis aproximada de 6,6 mg/kg/día), que se mantuvo durante 15 días. Posteriormente, se redujo a 15 µg/ml



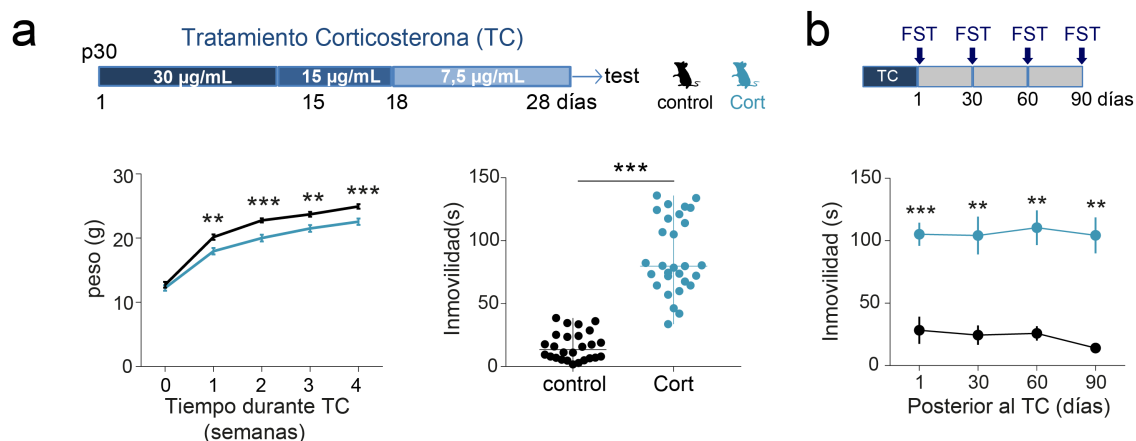
**Figura M1. Esquema del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA).** La respuesta al estrés se inicia con la activación de las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo (HTL). El HTL secreta la hormona CRH, que llega a la hipófisis anterior a través de la circulación portal-hipofisiaria. Allí, estimula la secreción de la hormona ACTH, que es transportada por la sangre a la corteza suprarrenal de la glándula suprarrenal, donde estimula la síntesis y secreción de glucocorticoides (cortisol en la especie humana, corticosterona, Cort, en roedores). Los glucocorticoides se secretan a la circulación sistémica pudiendo acceder a receptores para glucocorticoides en distintos órganos, incluido el cerebro.

(resultando en una dosis aproximada de 2,7 mg/kg/día) manteniéndose durante 3 días y, finalmente, la concentración fue de 7,5 µg/ml (resultando en una dosis aproximada de 1,1 mg/kg/día), que se mantuvo durante 10 días (Figura M2a).

Con este tratamiento de concentraciones decrecientes de Cort se consigue una recuperación gradual de los niveles endógenos en plasma al finalizar el tratamiento (Gourley y Taylor 2009). Dada su naturaleza fotosensible, la disolución de Cort se administró en biberones de agua recubiertos con papel de aluminio. La disolución de Cort se renovó cada 72 h para evitar su degradación. El consumo de la disolución de Cort fue evaluado pesando los biberones antes de la administración y a las 72 h (justo antes de ser renovados). La dosis media de consumo por animal fue analizada: peso del biberón/peso total de los animales de la jaula.

El tratamiento se inició en animales de 30 días de edad. Previamente, los animales se subdividieron por peso en dos grupos equitativos. Un grupo fue tratado con Cort (ratones Cort) y el otro solo con agua (grupo control). A lo largo del tratamiento se monitorizó el peso de los animales, una vez por semana, para confirmar que la reducción de peso inducida por Cort no era excesiva o perjudicial para el animal.

Asimismo, se realizó el test de natación forzada (ver apartado 9.6 de Materiales y métodos) al finalizar el tratamiento para comprobar su efecto en el comportamiento animal (Bogdanova et al., 2013) (Figura M2). En un grupo de animales, se repitió este test uno, dos y tres meses tras la finalización del tratamiento para demostrar que los efectos inducidos por el mismo eran persistentes a largo plazo (Figura M2b).



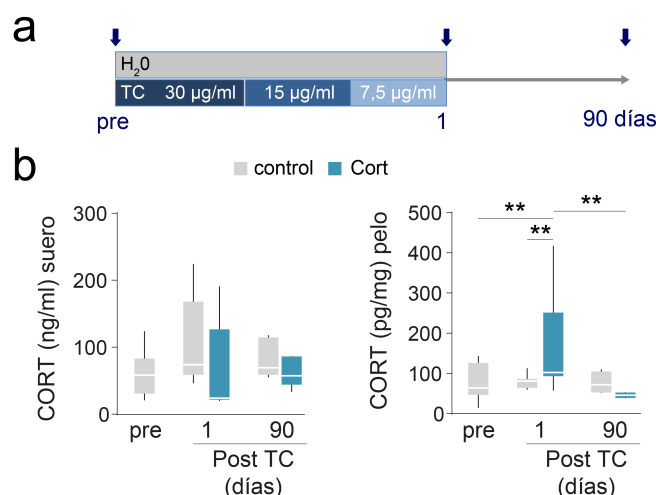
**Figura M2. Evaluación del tratamiento con Cort en ratón. a)** Esquema del tratamiento con corticosterona (TC) durante 28 días que es seguido por la realización de test comportamentales. Se administran dosis decrecientes de Cort en los tiempos indicados. Abajo Izda, peso de los ratones control (negro) y Cort (azul) monitorizado durante el TC (n=26 ratones control, n=29 ratones Cort). Nótese la reducción en la ganancia de peso en los ratones Cort (ANOVA de una vía, post hoc test de Holm-Sidak.  $P=0,002$   $P<0,001$ ). Los datos se muestran como la media  $\pm$  sem. Abajo dcha, duración acumulada de la inmovilidad durante el test de natación forzada (FST, del inglés *force swimming test*) en los ratones control y Cort. Nótese que los ratones Cort presentan mayores niveles de inmovilidad que los ratones control (ANOVA de una vía, post hoc test de Dunn.  $P<0,001$ ). Los datos se muestran como la mediana  $\pm$  rango (valores min. y max.). **b)** Efectos a largo plazo del TC en el FST. Nótese que los ratones Cort muestran un aumento de los niveles de inmovilidad hasta tres meses después del tratamiento (ANOVA de una vía, post hoc test de Holm-Sidak/Dunn.  $P<0,001$ , 1 día después del tratamiento;  $P=0,001$ , 30 días después del tratamiento;  $P=0,002$ , 60 días después del tratamiento;  $P=0,004$ , 90 días después del tratamiento). Los datos se muestran como la media  $\pm$  sem.

Los glucocorticoides se depositan en el pelo y circulan en el torrente sanguíneo, considerándose biomarcadores para la evaluación del estrés (Gong et al., 2015; Kalliokoski et al., 2019), por tanto, se realizaron medidas de los niveles de Cort en muestras de pelo y en suero sanguíneo (Figura M3). Las muestras se obtuvieron 1 día antes del inicio del tratamiento y 1 y 90 días después del tratamiento con Cort.

Las muestras de pelo se tomaron en ratones anestesiados, rasurando con una afeitadora eléctrica la línea media dorsal, y se conservaron a 4°C hasta su análisis. Se realizó un protocolo previo de extracción de Cort (Davenport et al., 2006; Erickson et al., 2017): las muestras de pelo se pesaron (peso medio  $36,17 \pm 2,47$  mg, 46 muestras) y se depositaron en tubos de polipropileno. Se lavaron tres veces con isopropanol (5 ml) agitando ligeramente, se decantó el exceso del mismo y las muestras se dejaron secar en la campana de extracción durante 48 h. Las muestras de pelo secas se transfirieron a tubos de polipropileno de 2 ml que contenían 2 bolas de acero para molerlas (molinillo de bolas, 30 Hz 30 min) hasta obtener un polvo fino. Se añadió 1 ml de metanol a las muestras y se mantuvieron en rotación toda la noche a TA. Las muestras se centrifugaron (4000 rpm, 10 min 25°C) y 0,5 ml del sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de polipropileno. Se evaporó el extracto (Speedvac 1 h a 30°C) y posteriormente se reconstituyó en 100 µL de tampón de ensayo suministrado en el kit de inmunoensayo enzimático de Cort.

Las muestras de sangre se obtuvieron entre las 09:00-10:00 de la mañana mediante cardiocentesis, tras la eutanasia de los animales por sobredosis de CO<sub>2</sub>. La sangre obtenida se mantuvo a TA durante 1 hora para facilitar su coagulación y posteriormente se centrifugó a 9000 g durante 10 min a 4°C. El suero fue recogido y conservado a -80°C hasta su posterior análisis.

Los niveles de Cort en las muestras de pelo y suero se cuantificaron utilizando un kit de ELISA comercial (DetectX® Corticosterone Enzyme Immunoassay Kit K014-H5 Arbor Assays). Las muestras fueron analizadas por duplicado siguiendo las instrucciones del fabricante.



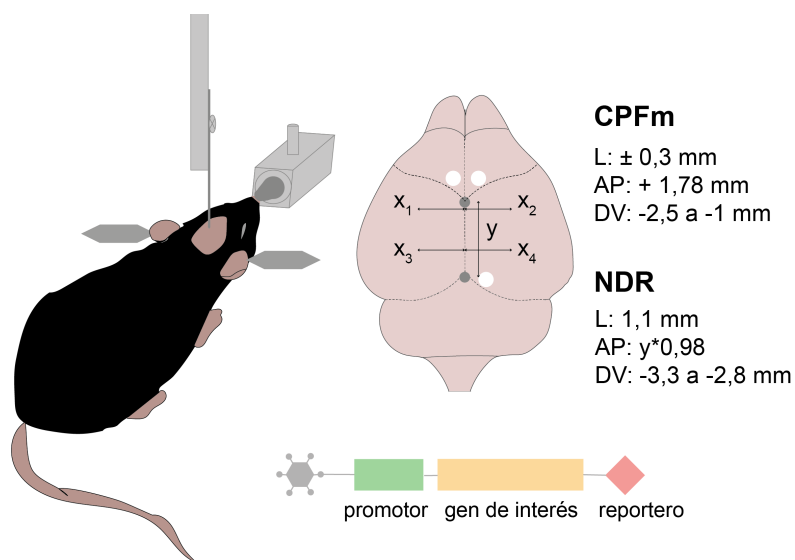
**Figura M3. Análisis de los niveles de Cort en suero y pelo.** **a)** Esquema del protocolo del tratamiento con agua/corticosterona (TC) durante 28 días indicando con flechas los períodos de tiempo en los que se realizó la toma de muestras de suero y pelo para las medidas de corticosterona (CORT) (pre tratamiento, 1 día y 90 días posterior al tratamiento). **b)** Izda, cuantificación de los niveles de CORT en suero antes del TC (pre, n=11 ratones), 1 día ( $N_{\text{control}}=10$  ratones;  $N_{\text{Cort}}=7$  ratones) y 90 días ( $N_{\text{control}}=5$  ratones;  $N_{\text{Cort}}=5$  ratones) después del TC. Nótese la ausencia de diferencias en los niveles de CORT en suero en los diferentes momentos de extracción (ANOVA de dos vías,  $P>0,05$ ). Dcha, cuantificación de los niveles de CORT en pelo antes del TC (n=17 ratones), 1 día ( $N_{\text{control}}=10$  ratones;  $N_{\text{Cort}}=11$  ratones) y 90 días ( $N_{\text{control}}=4$  ratones;  $N_{\text{Cort}}=4$  ratones) después del TC. Los ratones Cort presentan un aumento de los niveles de CORT en pelo un día después del TC (ANOVA de dos vías,  $P=0,001$ ) recuperando los niveles basales a los 90 días (ANOVA de dos vías,  $P=0,310$ ). La línea media en los diagramas de cajas y bigotes representa la mediana, los bordes superior e inferior indican los percentiles 25 y 75, respectivamente, y los bigotes se extienden hasta los datos máximo y mínimo.

### 3. Cirugías

#### 3.1. Infecciones virales

Los ratones C57BL/6J se anestesiaron por vía inhalatoria utilizando isofluorano (5% para la inducción y 2-1,5% para el mantenimiento durante la cirugía). Se determinó el efecto de la anestesia comprobando el reflejo plantar. Para evitar la hipotermia, los animales se colocaron sobre una manta térmica a 37°C en el aparato estereotáxico, y se les aplicó vaselina en los ojos para evitar la desecación de las córneas. Se les administró subcutáneamente buprenorfina

0,1 mg/kg (Buprenex®) como analgésico. La cabeza fue rasurada con una afeitadora eléctrica, se desinfectó la zona con etanol 70% y se aplicaron sobre la piel lidocaína y Betadine® como anestésico y antiséptico local, respectivamente. Se realizó una incisión longitudinal a lo largo de la línea media, se retiró la piel hacia los lados y con la ayuda de dos pinzas quirúrgicas se retiró el periostio. De esta manera el cráneo quedó al descubierto y los dos puntos de unión de las suturas frontoparietal -bregma- y parietooccipital -lambda- quedaron expuestos. Se comprobó el correcto alineamiento de bregma y lambda, tomando distintas coordenadas laterales a la línea media a distintas distancias en el eje anteroposterior con el brazo del aparato estereotáxico (Figura M4). Se localizaron las coordenadas estereotáxicas de acuerdo con el atlas de Paxinos y Franklin (Paxinos y Franklin 2019). Para CPFm se utilizaron las siguientes coordenadas, tomando como referencia bregma: 1,78 mm anterior,  $\pm 0,3$  mm lateral y 2,5-1 mm ventral. Para las coordenadas del NDR, la coordenada posterior se escaló utilizando la distancia bregma-lambda x 0,98 (Matthews et al., 2016), se tomó 1,1 mm lateral desde lambda y 3,3-2,8 mm ventral, con un ángulo de 20°. En los lugares pertinentes para cada región se trepanó el cráneo utilizando una trepanadora (Dremel®), evitando dañar el tejido cerebral y controlando el sangrado si lo hubiera aplicando suero fisiológico a 4 °C (suero fisiológico vitulina 0,9%). Para la inyección intracraneal y bilateral de virus se utilizó un capilar de vidrio de borosilicato (Drummond Wiretrol, 10  $\mu$ L), estirado con un puller (P1000, Sutter Instruments) mediante el uso de un nanoinyector (Stoelting Co.). El capilar de vidrio se rellenó con un aceite teñido de color rojo (colorante Sudan IV) y posteriormente con el virus, lo que permitió distinguir dos fases y comprobar que la introducción del virus en el tejido cerebral era exitosa.



**Figura M4. Esquema de craneotomía e inyecciones virales.** Representación de un animal en el aparato estereotáxico y un cerebro mostrando distintas coordenadas de referencia tomadas durante la cirugía. Bregma y lambda se representan con un círculo gris. Se toman varias coordenadas laterales desde la línea media x1 y x2, x3 y x4, para garantizar que el cráneo no sufre ninguna inclinación. Se mide la distancia bregma-lambda (y), y posteriormente se localizan las coordenadas para las áreas de interés, CPFm y NDR (círculos blancos). En la parte inferior se muestra un esquema de los principales componentes de los agentes virales usados.

El capilar de vidrio se introdujo lentamente, utilizando el brazo del aparato estereotáxico, en los orificios abiertos durante la cirugía con el fin de causar el menor daño posible sobre el tejido. Una vez alcanzada la coordenada deseada se inyectó el volumen del virus (0,4-0,6  $\mu$ l) a una velocidad de 50 nl/min. Después de la inyección se mantuvo el capilar durante 5 min para prevenir el reflujo del virus, y tras retirarlo se suturó la piel, dando puntos individuales, utilizando seda de sutura trenzada reabsorbible. Tras cerrar la piel se aplicó un antiséptico (Betadine®) sobre los puntos. Los niveles de anestesia se fueron reduciendo de forma progresiva, y una vez despierto el animal se le trasladó a una jaula individual, calentada por debajo con una manta térmica para facilitar su recuperación. Posteriormente, se devolvieron los ratones a sus jaulas originales. Durante los tres días siguientes a la operación se les administró subcutáneamente buprenorfina 0,1 mg/kg (Buprenex®), monitorizó el peso y se evaluó su estado general.

A continuación, se detallan los virus utilizados para cada experimento. Para los experimentos *ex vivo* e *in vivo* de imagen de  $Ca^{2+}$  se usó el virus AAV5-gfaABC1D-cyto-GCaMP6f (Addgene 52925; título viral  $1,3 \times 10^{13}$  GC/ml) que en algunos experimentos en rodajas de cerebro se coinfectó con el virus AAV5-GFAP-hM3Dq-mCherry (Addgene 50478; título viral  $2 \times 10^{13}$  GC/ml) o con el virus AAV5-GFAP-mcherry-cre (UNC Vector Core; título viral  $4,3 \times 10^{12}$  GC/ml). En el caso de los experimentos de electrofisiología *ex vivo* además de los virus GCaMP6f y GFAP-hM3Dq anteriormente citados, también se utilizó el virus AAV9-hSyn-ChrimsonR-tdTom (UNC Vector Core; título viral  $4,1 \times 10^{12}$  GC/ml) y el virus AAV9-CaMKIIa-eYFP (Penn Vector Core; título viral  $2,55 \times 10^{12}$  GC/ml). Para los registros de la actividad serotoninérgica *in vivo* se usó el virus AAV5-CAG-flex-iSeroSnFR (Addgene 128486; título viral  $5 \times 10^{12}$  GC/ml, Unitat de Vectors Virals, UAB) coinfectado con el virus AAV5-GFAP-mcherry-cre (UNC Vector Core; título viral  $4,3 \times 10^{12}$  GC/ml) y el virus AAV5-GFAP-eGFP-WPRE-hGH (Addgene 105549; título viral  $1,3 \times 10^{13}$  GC/ml). Para los experimentos de comportamiento se utilizaron el virus GFAP-hM3Dq citado con anterioridad y el virus AAV8-GFAP104-mCherry (UNC Vector Core; título viral  $2,7 \times 10^{12}$  GC/ml).

Los experimentos se realizaron a las 2-3 semanas tras la cirugía.

### 3.2. Implantación de fibra óptica

Se utilizaron cánulas de monofibra óptica multimodales de 400  $\mu$ m (ref. MFC\_400/430-0.66\_2.0\_MF1.25\_FLT, apertura numérica 0,66, Doric Lenses o ref. FP400URT, apertura numérica 0,50, Thorlabs). Estas cánulas están formadas por dos componentes, la fibra óptica y la férula. El extremo de la fibra que se introduce dentro de la férula está pulido y el extremo opuesto que sobresale es el que se implanta.

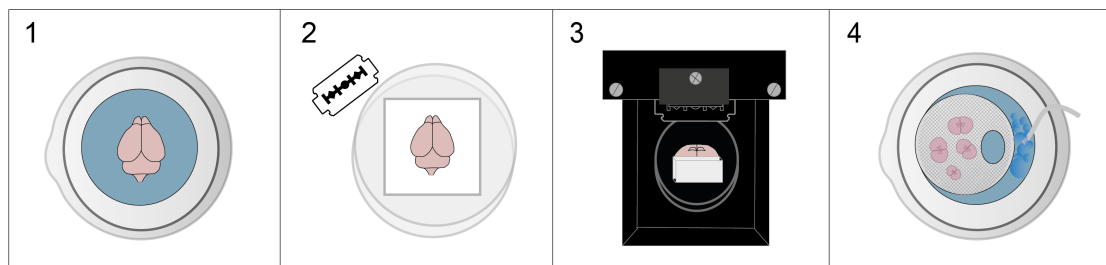
La implantación de la fibra se realizó en el hemisferio derecho tras la inyección del virus. En este tipo de cirugías, tras retirar el periostio se secó cuidadosamente el cráneo, se raspó y se realizaron pequeñas marcas en distintos sentidos utilizando un escalpelo, con el fin de que posteriormente el cemento dental se fijase correctamente al cráneo.

Así, se introdujo la fibra muy lentamente en el tejido hasta la coordenada calculada (para CPFm: -1,5 mm, para DRN: -2,7 mm) y posteriormente se aplicaron varias capas de cemento dental (cemento de ionómero de vidrio, Meron, VOCO) alrededor de la fibra permitiendo la adhesión de la fibra con el cráneo. Posteriormente se aplicó cemento en el resto del cráneo y si fue necesario se dio algún punto de sutura. Una vez que el cemento se secó completamente se aplicó una pequeña capa de pegamento (Loctite, super glue) para evitar que el cemento pudiera agrietarse.

## 4. Obtención de rodajas de cerebro

Los registros de electrofisiología e imagen de  $\text{Ca}^{2+}$  *ex vivo* se realizaron en rodajas de CFPm. En primer lugar, los animales fueron decapitados y de forma inmediata se extrajo el cerebro y se colocó en líquido cefalorraquídeo artificial (LCA) a 4°C burbujeado con carbógeno (95%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). El LCA contiene [en mM]: NaCl 124, KCl 2,69,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,25,  $\text{MgSO}_4$  2,  $\text{NaHCO}_3$  26,  $\text{CaCl}_2$  2 y glucosa 10, con un pH de 7,3.

Posteriormente se utilizó un vibrátomo (Leica V71200S, Alemania) para hacer rodajas coronales de 350  $\mu\text{m}$  de grosor, que se incubaron en una cámara de mantenimiento con LCA durante 1h, a TA (22-24°C) y constantemente burbujeado con carbógeno (se muestran los distintos pasos en la Figura M5). Las rodajas fueron transferidas a una cámara de registro que contenía LCA constantemente burbujeado con una perfusión de flujo constante de 2 ml/min.



**Figura M5. Extracción y preparación de rodajas de cerebro.** Esquemas de los pasos a seguir para la obtención de las rodajas de cerebro. (1) Extracción del cerebro en LCA/NMDG-HEPES a 4°C. (2) Posicionamiento del cerebro sobre un papel de filtro y corte de la parte caudal del cerebro. (3) Posicionamiento y adhesión del cerebro a la base del vibrátomo. Colocación del bloque de agarosa en la parte posterior del cerebro opuesta a la cuchilla para facilitar la sujeción del mismo. Corte de rodajas de CPFm de 350  $\mu\text{m}$ . (4) Incubación de las rodajas en una cámara sumergidas en LCA constantemente burbujeado (95%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) durante al menos 1h antes del inicio del registro.

Las células se visualizaron con los microscopios de epifluorescencia Olympus BX50WI o Nikon Eclipse FN1 con un contraste de interferencia diferencial. Se utilizaron objetivos de 10x para enfocar la rodaja e identificar el área de estudio y de 40x de inmersión para poder visualizar e identificar a nivel celular.

En el caso de animales adultos de más de 2 meses de edad, se utilizó además del LCA, una solución NMDG-HEPES (Ting et al., 2014), con el fin de incrementar la viabilidad de las células.



Esta solución se utilizó a 4°C para la extracción y corte del cerebro y posteriormente a 37°C para una incubación inicial de las rodajas. Después las rodajas se incubaron en el LCA 1h a TA. La solución NMDG-HEPES contiene [en mM]: NMDG 92, KCl 2,5, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2, NaHCO<sub>3</sub> 30, HEPES 20, glucosa 25, tiourea 2, Na-ascorbato 5, Na-piruvato 3, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,5, y MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10 (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, pH = 7,3).

Para los experimentos de electrofisiología *ex vivo* en los que se registraron corrientes lentas de entrada (definidas como SICs, del inglés *Slow Inward Currents*) se utilizó un LCA modificado libre de Mg<sup>2+</sup>, para optimizar la activación de los receptores NMDA. Esta solución contiene [en mM]: NaCl 124, KCl 2,69, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,25, NaHCO<sub>3</sub> 26, glucosa 10, CaCl<sub>2</sub> 4 y glicina 0,01 (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, pH = 7,3).

## 5. Imagen de Ca<sup>2+</sup>

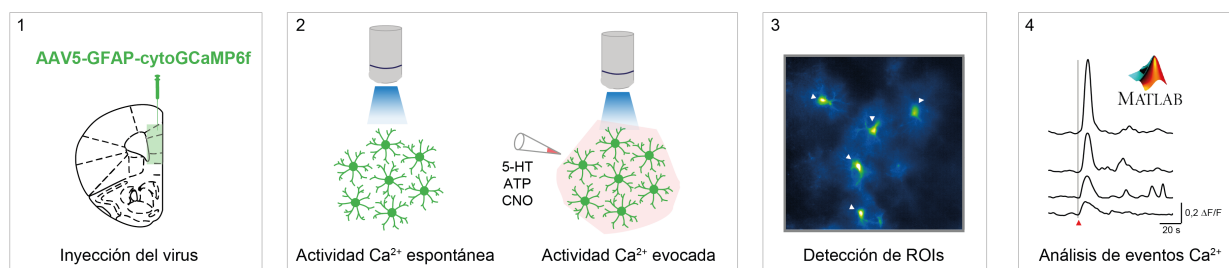
### 5.1. Registros *ex vivo*

Las dinámicas de Ca<sup>2+</sup> en los astrocitos se monitorizaron utilizando el indicador de Ca<sup>2+</sup> codificado genéticamente GCaMP6f. De esta manera ratones C57BL/6, control y tratados con Cort, y ratones *Ip3r2*<sup>-/-</sup> fueron inyectados bilateralmente en la CPFm con el virus AAV5-gfaABC1D-cyto-GCaMP6f y transcurridas 2-3 semanas se analizaron las rodajas corticales (Figura M6). Este indicador permite observar un marcaje de Ca<sup>2+</sup> prominente en el soma y en los procesos cercanos al mismo (Srinivasan et al., 2015). Para visualizar los astrocitos de capa 2/3 de CPFm se utilizó una cámara CCD (ORCA-235, Hamamatsu, Japón) acoplada al microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse FN1). Las células se iluminaron durante 100-200 ms a una longitud de onda de 490 nm, utilizando para ello un sistema de LEDs (CoolLED pE-300), y las imágenes fueron adquiridas a 1 Hz durante 2 min. El sistema de LEDs y la cámara fueron controlados y sincronizados mediante el software NIS Elements (Nikon, Japón). Se monitorizó la actividad de Ca<sup>2+</sup> espontánea durante 2 min, en presencia de tetrodotoxina (TTX), y la actividad evocada, para lo que se registraron 30 s de variaciones de Ca<sup>2+</sup> basales, seguido de 60 s tras la aplicación local de 5-HT (1 mM; 10 s, 1 bar), 4-bromo-3,6-dimetoxibenzociclobuten-1-il metilamina hidrobromida (TCB-2, 10 μM; 10 s, 1 bar), ATP (1 mM; 10 s, 1 bar), o CNO (1 mM; 2 s, 1 bar). La aplicación local de los agonistas se realizó mediante pulsos de presión inducidos con un sistema de eyección de presión (Picospritzer II, Parker Hannifin, EE.UU.) a través de una micropipeta de vidrio de borosilicato.

En los experimentos de actividad de Ca<sup>2+</sup> evocada, para poder aislar la respuesta específica de los astrocitos a 5-HT, se perfundió el siguiente cóctel de antagonistas en el LCA: TTX 1 μM, picrotoxina 50 μM, AM251 2 μM, MRS 2179 10 μM, CGP 55845 5 μM, LY367385 100 μM. Para los experimentos realizados con ATP, MRS 2179 se excluyó del cóctel. Para los experimentos con CNO, se añadió TTX al LCA. Los antagonistas de los receptores de la familia 5-HT<sub>2</sub> (ketanserina 10 μM, RS127445 1 μM, RS102221 1 μM, MDL100907 1 μM) y 5-HT<sub>1A</sub> (WAY100135 10 μM) se aplicaron en el LCA mediante perfusión continuada durante al menos 15 min previos a los registros.



En los experimentos en los que se combina imagen de  $\text{Ca}^{2+}$  en CPFm y estimulación optogenética de las fibras del NDR, tanto los registros basales como la actividad evocada se registraron durante 60 s.



**Figura M6. Registro y análisis de la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos *ex vivo*.** (1) Esquema de la inyección del virus que contiene el indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  (GCaMP6f) que se expresará de manera selectiva en astrocitos, bajo el promotor de GFAP. (2) Registro de la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos, espontánea o evocada (mediante aplicación de pulsos de presión de 5-HT, ATP o CNO). (3) Uso del software ImageJ para la localización de los astrocitos (flechas blancas) y la selección de regiones de interés (ROIs). (4) Los datos de  $F(t)$  de cada ROI se importan a MATLAB y se procede al cálculo del  $\Delta F/F$ . Se muestra un ejemplo representativo de eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  evocados tras la aplicación local de 5-HT.

Las regiones de interés (en inglés, *regions of interest*, ROIs) se seleccionaron utilizando el software ImageJ. Se promedió la intensidad de fluorescencia ( $F$ ) de todos los píxeles que componen cada ROI para obtener un único valor durante el curso temporal  $F(t)$  por ROI.

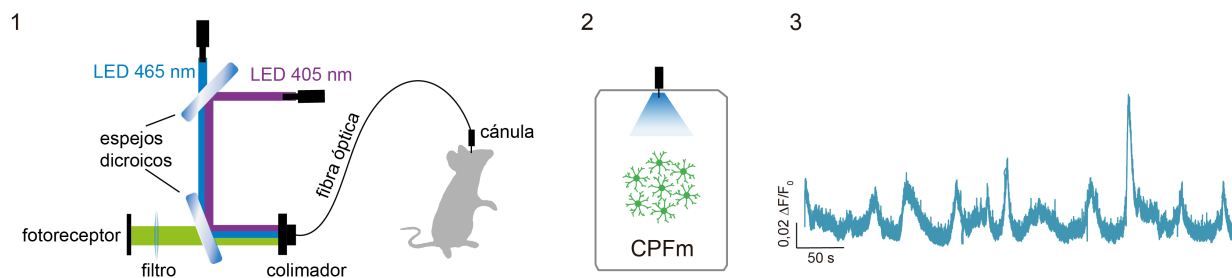
En un subconjunto de experimentos, se incubaron rodajas de CPFm con Fluo-4 AM (se dejó caer 1  $\mu\text{l}$  de colorante 2 mM sobre la CPFm, alcanzando una concentración final de 2-10  $\mu\text{M}$ ) disuelto en plurónico al 0,02% y DMSO al 0,04% durante 15-20 min a TA, y el análisis de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  se restringió al soma celular.

## 5.2. Registros *in vivo*

De la misma manera que para los registros de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitario *ex vivo*, la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  *in vivo* se estudió, en ratones silvestres y tratados con Cort, utilizando el indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  codificado genéticamente GCaMP6f. Tras la craneotomía e inyección del virus AAV5-gfaABC1D-cyto-GCaMP6f, se implantó una cánula de fibra óptica, tal y como se indica en el apartado 3.2. Al cabo de 2-3 semanas se procedió al inicio de los registros de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Se utilizó un sistema de fotometría de fibra Doric (FPS\_1S\_GCaMP, Doric Lenses) con dos LEDs, un LED de 405 nm para medir la señal isosbética, y un LED de 465 nm para excitar la fluorescencia de GCaMP6f.

Se iluminó la CPFm con luz azul (465 nm) a una potencia de 20-50  $\mu\text{W}$ . Las señales para la luz azul y ultravioleta fueron recogidas de manera intercalada a una frecuencia de muestreo de 100 Hz, demoduladas y analizadas con un código específico en MATLAB (ver apartado 10.2 de Análisis de datos) (Figura M7).

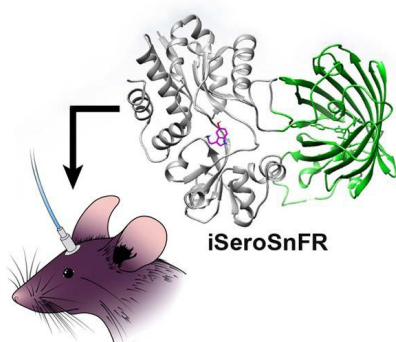


**Figura M7. Sistema de fotometría de fibra óptica y registro de señales de  $\text{Ca}^{2+}$  *in vivo*.** (1) Esquema de los principales componentes del aparato de fotometría de fibra óptica que presenta dos fuentes de luz (LED 465 nm y LED 405 nm) que atraviesan distintos espejos dicróicos, cuya función es la de combinar las luces de excitación (465/405nm) y a su vez dividir las señales fluorescentes procedentes de la muestra. Al excitarse el indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  GCaMP6f emite fluorescencia (pico máximo 513 nm, haz verde) que se propaga a través de la fibra óptica, y es filtrada y medida por el fotorreceptor. El colimador convierte las trayectorias divergentes de los haces de luz LED en trayectorias paralelas. El fotorreceptor transforma la señal óptica en eléctrica que es posteriormente amplificada por el sistema de registro. (2) Esquema de estimulación a través de la fibra óptica para excitar al indicador GCaMP6f expresado en los astrocitos de la CPFm. (3) Trazo representativo de la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitario poblacional registrada y posteriormente analizada con un código específico en MATLAB.

Estos registros de la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  *in vivo* se combinaron con la realización de tareas comportamentales. Se utilizó el test de campo abierto (ver apartado 9.1 de Paradigmas comportamentales) para monitorizar las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  espontáneas y el test de sociabilidad para registrar señales de  $\text{Ca}^{2+}$  evocadas por la exploración del animal hacia un objeto neutro y un ratón no familiar (ver apartado 9.5 de Paradigmas comportamentales).

## 6. Registros de la actividad serotoninérgica *in vivo*

La actividad serotoninérgica se monitorizó mediante la utilización de un sensor de 5-HT (iSeroSnFR), que permite registrar en tiempo real la presencia de 5-HT en el medio extracelular (Unger et al., 2020) (Figura M8).



**Figura M8. Esquema del sensor de 5-HT, iSeroSnFR.** El sensor iSeroSnFR se ha rediseñado a partir del sensor de ACh iAChSnFR0.6, exhibiendo 5000 veces más afinidad por 5-HT. La proteína bacteriana (color gris) de unión periplásmica PBP (del inglés bacterial Periplasmic Binding Protein) contiene el sitio de unión a 5-HT y está ligada a la proteína verde fluorescente GFP (del inglés Green Fluorescent Protein). Adaptado de Unger et al., 2020.

Ratones C57BL/6, silvestres y tratados con Cort, fueron inyectados en el hemisferio derecho de la CPFm con el virus AAV5-CAG-flex-iSeroSnFR coinfectado con AAV5-GFAP-mcherry-cre; o con el virus AAV5-GFAP-eGFP-WPRE-hGH. En los mismos ratones se inyectó el virus AAV9-hSyn-ChrimsonR-tdTom en el NDR. De manera seguida a la inyección de los virus, se implantó una cánula de fibra óptica en el

hemisferio derecho de la CPFm y en el NDR. Transcurridas 2-3 semanas desde la cirugía se iniciaron los registros para monitorizar la actividad serotoninérgica.

Se utilizó el mismo sistema de fotometría de fibra Doric que para los registros de la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  *in vivo*. De esta manera, se utilizó el LED de 465 nm (70-130  $\mu\text{W}$ ) para la excitación del sensor iSeroSnFR y un LED externo de 590 nm (M590F3- 590 nm, Fiber-Coupled LED, 1000 mA, SMA-LEDD1B-T-Cube LED driver; 5 mW) para la estimulación optogenética del NDR.

Se registraron las señales de iSeroSnFR y eGFP mientras el animal se movía con libertad en una arena de campo abierto. Los animales se sometieron a 2-6 ensayos. En cada ensayo se registraron 3 min de actividad espontánea seguidos de 2-4 pulsos de estimulación del NDR (40 Hz, 10 s) con intervalos de 50 s entre pulsos. Las señales de fotometría se recogieron de manera intercalada y con una frecuencia de muestreo de 50 Hz. Posteriormente se analizaron utilizando un código específico en MATLAB (ver apartado 10.3 de Análisis de datos).

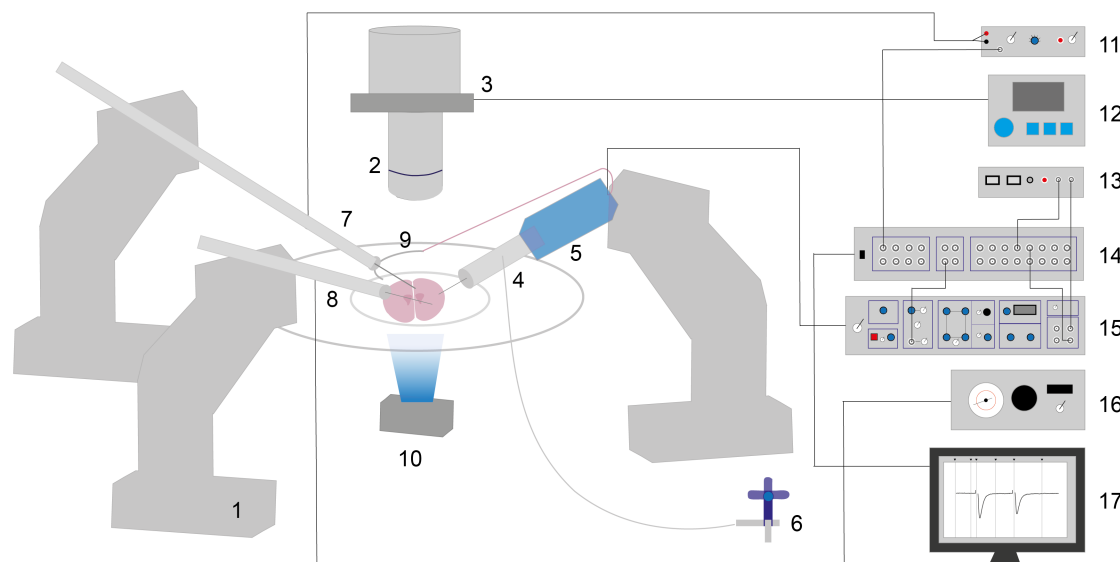
## 7. Registros electrofisiológicos *ex vivo*

Se realizaron registros electrofisiológicos de neuronas piramidales y astrocitos de capa 2/3 de CPFm mediante la técnica de *patch clamp* en su configuración de célula completa (en inglés, *whole-cell*) en los modos de fijación de voltaje y de corriente (en inglés, *voltage-clamp* (VC) y *current-clamp* (CC)). Las corrientes neuronales se registraron utilizando capilares de borosilicato (OD-ID:1,5-0,86mm; Sutter Instrument CO., Novato, CA) (Figura M9) con una resistencia de 3-6 M $\Omega$ , rellenados con una solución intracelular que contenía [en mM]: K-gluconato 135, KCl 10, HEPES 10,  $\text{MgCl}_2$  1 y ATP- $\text{Na}_2$  2 (pH = 7,3). En algunos experimentos, la solución intracelular se modificó añadiendo GDP $\beta$ S 2 mM. Los registros electrofisiológicos de astrocitos se realizaron utilizando capilares de borosilicato con una resistencia de 8-10 M $\Omega$  y la solución intracelular usada tuvo la siguiente composición [en mM]: BAPTA- $\text{K}_4$  40, NaCl 8,  $\text{MgCl}_2$  1, HEPES 10, Guanosina-5'-trifosfato (GTP) sal tris 0,4 y ATP- $\text{Na}_2$  2 (pH = 7,3). Los registros de astrocitos realizados tuvieron una duración de al menos 30 min, para permitir la diálisis del BAPTA a través de las conexiones tipo gap que conectan la red astrocitaria.

Para los experimentos en los que se estudiaron SICs y corrientes espontáneas en miniatura (mEPSCs del inglés *miniature Excitatory Postsynaptic Currents*) se añadió TTX (1 $\mu\text{M}$ ) al LCA. Las SICs se distinguieron de las mEPSCs por sus constantes de activación y caída (Perea y Araque 2005b). La frecuencia de SICs se suprimió en presencia de ácido D-(-)-2-amino-5-fosfonopentanoico (D-AP5, 50  $\mu\text{M}$ ), un antagonista selectivo de los receptores NMDA ( $0,27 \pm 0,04$ , n= 35 en control,  $0,05 \pm 0,02$ , n= 13 en presencia de D-AP5; ANOVA de una vía, post hoc test de Dunn,  $P < 0,001$ ).

Los registros se obtuvieron con amplificadores PC-ONE (Dagan Corporation, Minnesota), (Figura M9) en fijación de voltaje, manteniendo el potencial de membrana de las células a -70 mV. La resistencia en serie fue monitorizada durante todo el experimento aplicando un pulso intracelular de -5 mV durante 20 ms. Aquellos registros en los que la resistencia de acceso superó un 20% de cambio se eliminaron.

Las señales fueron filtradas con un *HumBug* (Quest Scientific Instruments Inc., Canadá) para eliminar el ruido eléctrico de corriente alterna (50/60 Hz) (Figura M9). Posteriormente, las señales fueron filtradas a 1 kHz y muestreadas a 10 kHz con una tarjeta de conversión analógico-digital Digidata 1440 (Axon Instruments, EE.UU.).



**Figura M9. Esquema de un equipo de electrofisiología para registros *ex vivo*.** Esquema de los distintos componentes para realizar registros electrofisiológicos *ex vivo*. (1) Micromanipulador. (2) Objetivo 10x/40x del microscopio. (3) Cámara acoplada al microscopio. (4) Holder. (5) Headstage o preamplificador. (6) Válvula de 3 vías. (7) Capilar de borosilicato septado para estimulación. (8) Capilar de borosilicato para aplicar un pulso de presión. (9) Tierra fabricada con alambre de plata. (10) Fuente de luz. (11) Estimulador. (12) Sistema de iluminación CoolLED. (13) Filtro de corriente alterna o *HumBug*. (14) Tarjeta de conversión analógico-digital. (15) Amplificador. (16) Sistema de aplicación de pulsos de presión o *picospritzer*. (17) Ordenador y software pCLAMP.

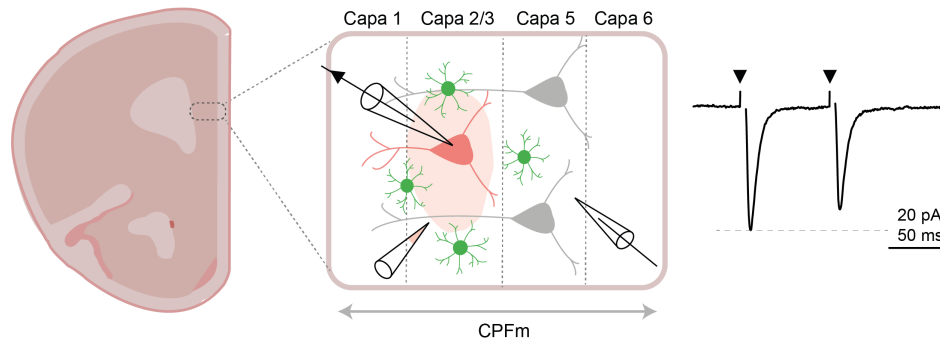
Se utilizó el software pCLAMP 10.7 (Molecular Devices) para la generación de protocolos de estimulación, adquisición y visualización de las señales y almacenamiento de los datos.

Se utilizaron dos métodos de estimulación:

- Estimulación eléctrica

Se usaron electrodos constituidos por dos cables de plata clorurados (NaClO) introducidos en una pipeta septada (World Precision Instruments). Los capilares (2-5  $\mu\text{m}$  de diámetro en el extremo) se rellenaron con LCA y se conectaron al estimulador Dagan S900 (Dagan Instruments, Inc). El electrodo de estimulación se posicionó en la capa 5 de la CPFm, con el fin de estimular las neuronas y fibras de dicha capa.

Se aplicaron pares de pulsos de corriente (1 ms duración; 75 ms intervalo entre pulsos) a 0,33 Hz a través del electrodo de estimulación mientras la célula era registrada en modo de VC (Figura M10).



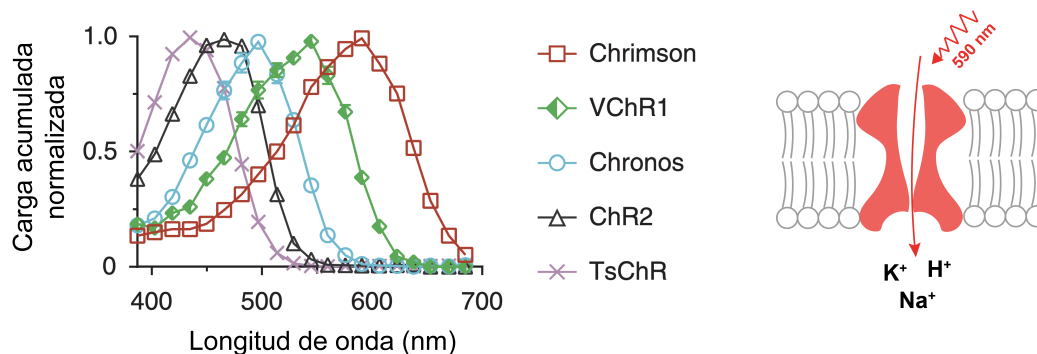
**Figura M10. Aproximación experimental para el registro electrofisiológico de neuronas piramidales de capa 2/3 de CPFm.** Izda, esquema de la CPFm y un diagrama del posicionamiento de la pipeta de estimulación en C5 y de las pipetas del pulso de presión y de registro en C2/3. Dcha, ejemplo representativo de EPSCs registrados durante el protocolo de pares de pulsos de corriente. El triángulo negro simboliza el momento de aplicación del pulso eléctrico.

Se midió la actividad sináptica basal el tiempo necesario hasta obtener 5 min de registro estables. Posteriormente se estudió el efecto de la aplicación local de 5-HT/TCB-2/CNO en capa 2/3 de CPFm sobre las corrientes postsinápticas excitadoras, EPSCs (del inglés, *Excitatory postsynaptic current*). Con el fin de bloquear la actividad sináptica inhibitoria dependiente de GABA<sub>A</sub>R se incluyó picrotoxina (50  $\mu$ M) en el LCA.

#### - Estimulación optogenética

Transcurridas 2-3 semanas desde la infección de las neuronas del NDR con el virus AAV9-hSyn-ChrimsonR-tdTom, se procedió a la activación de las fibras del NDR que proyectan a CPFm. Así, las fibras tdTom presentes en la CPFm (en su mayoría serotoninérgicas, ver Figura R4c) se estimularon utilizando un sistema de iluminación CoolLED (LED 550 nm), aplicando pulsos de 50 ms a 5 Hz (con una potencia de 1 mW). De esta manera se indujo la liberación endógena de 5-HT en CPFm.

Para los registros de la señalización de Ca<sup>2+</sup> astrocitaria *ex vivo*, la estimulación de las fibras que expresan ChrimsonR en CPFm se realizó mediante la utilización de un láser (640-660 nm) externo al microscopio. Se aplicaron pulsos de 10 s de luz continua (con una potencia de <1 mW).



**Figura M11. Espectro de excitación de diversas opsinas ligadas a canales catiónicos.** Izda, nótese que el espectro de excitación de ChrimsonR está desplazado hacia la luz roja 45 nm en comparación con las otras opsinas, por lo que se excitará preferentemente con luz roja con un pico de excitación máxima en 590 nm.

Dcha, esquema de ChrimsonR, la luz roja activa la opsina, como resultado el canal se abre y se produce el paso de cationes hacia el interior celular provocado la generación de potenciales de acción. Adaptado de Klapoetke et al., 2014.

Para el análisis de los registros electrofisiológicos neuronales *ex vivo*, se descartaron aquellos que no mostraron respuestas estables. Asimismo, aquellos registros que no duraron >25 min se excluyeron de la cuantificación de las respuestas a largo plazo (20-25 min), pero se consideraron para el análisis de respuestas cortas.

Para monitorizar la despolarización o hiperpolarización de las membranas neuronales inducida por la aplicación del pulso de presión, se registraron los cambios en la corriente de *holding* (CH) y se calcularon como índice CH, donde *i* = valor de CH en diferentes puntos temporales tras la aplicación del pulso de presión; y basal= CH media antes de la aplicación del pulso de presión.

$$\text{Índice CH} = \frac{\text{CH (i)} - \text{CH (basal)}}{\text{valor absoluto CH (i)} + \text{CH (basal)}}$$

## 8. Técnicas inmunohistológicas

Para verificar la correcta expresión de los distintos vectores virales, así como la localización de la fibra óptica implantada o para proceder a la reconstrucción morfológica de astrocitos se realizaron técnicas inmunohistológicas.

Los ratones fueron sometidos a una perfusión transcardiaca. Para ello se les administró i.p. una dosis letal de pentobarbital sódico (80 mg/kg). Una vez que el ratón no presentó ningún reflejo plantar, se procedió a realizar un corte longitudinal exponiendo la cavidad abdominal, se separó la piel hacia los laterales, se realizó un corte en el diafragma y se expuso el corazón. Se retiró el pericardio y se introdujo una aguja hipodérmica (25G 0,5 x 15mm Luer Lock, Braun) en el ventrículo izquierdo. A través de la aguja se introdujo un tampón fosfato salino (en inglés *phosphate buffered saline*, PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4; 15714 Electron Microscopy Sciences, EM Grade) con la ayuda de una bomba peristáltica. De forma rápida se realizó una incisión en la aurícula derecha y se continuó con el flujo de salino hasta exanguinar el sistema circulatorio del animal. Posteriormente se introdujeron, de la misma manera, 50 ml de paraformaldehído (PFA) frío al 4% en PBS 1x para fijar el tejido. Se procedió a extraer el encéfalo y se mantuvo en la misma solución de PFA a 4°C para su postfijación durante 12-24 h. Transcurrido ese tiempo, se obtuvieron rodajas coronales (50 µm) del área del cerebro deseada, utilizando un vibrátomo VT1000S (Leica). Las rodajas se montaron directamente en un portaobjetos utilizando un medio de montaje (Vectashield *antifading mounting medium*, H-1000, Vector Laboratories, California) o se prepararon para realizar un marcaje histológico.

En este último caso, las rodajas se lavaron con PBS (3 veces, 20 min) y se permeabilizaron utilizando 0,2% Triton en PBS (3 veces, 20 min) a TA. Esta permeabilización no se realizó cuando se utilizó posteriormente el anticuerpo anti-5HT<sub>2A</sub>R). Para evitar marcajes



inespecíficos, las rodajas se bloquearon a TA con 1-5% suero de cabra y 0,3 % Triton X-100 durante 1 h. Posteriormente las muestras se incubaron con los correspondientes anticuerpos primarios (ver Tabla 1) en la solución de bloqueo a 4°C durante 12 h (48 h para la incubación con el anticuerpo anti-5HT<sub>2A</sub>R).

<b>Anticuerpo primario</b>	<b>Referencia</b>	<b>Dilución</b>	<b>Marcador</b>
<b>rabbit anti-S100</b>	Abcam, AB_306716	1:200	astrocitos
<b>mouse anti-SERT</b>	Synaptic Systems, CI.64G6	1:500	transportador para 5-HT
<b>mouse anti-NeuN</b>	Merck, MAB377	1:500	neuronas
<b>mouse anti-GFAP</b>	Sigma-Aldrich, MAB360	1:500	astrocitos
<b>rabbit anti-5HT<sub>2A</sub>R</b>	Sigma-Aldrich, HPA014011	1:100	receptor 5-HT <sub>2A</sub>

**Tabla 1. Lista de anticuerpos primarios**

Transcurrido ese tiempo, las muestras se lavaron en solución de bloqueo (3 veces, 20 min) y se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios (ver Tabla 2) durante 1 h a TA.

<b>Anticuerpo secundario</b>	<b>Referencia</b>	<b>Dilución</b>
<b>Goat anti-mouse Alexa Fluor 488</b>	Bioss Inc., Woburn, MA, AB_10892893	1:200
<b>Goat anti-rabbit Alexa Fluor 647</b>	Thermo Fisher Scientific, AB_2535813	1:200
<b>Goat anti-rabbit Alexa Fluor 488</b>	Thermo Fisher Scientific, AB_143165	1:200
<b>Goat anti-mouse Pacific blue</b>	Thermo Fisher Scientific, AB_10374586	1:200

**Tabla 2. Lista de anticuerpos secundarios**

Se procedió, a continuación, al lavado de las muestras con 0,1% Triton X-100 en PBS (3 veces, 20 min). En algunos casos, las muestras se incubaron con DAPI (1,5 µg/mL, Sigma-Aldrich) durante 10 min. Por último, las muestras se lavaron en PBS (3 veces, 20 min) y se montaron sobre un portaobjetos. Las imágenes se adquirieron con un microscopio confocal Leica SP-5 (Leica Biosystems) o Stellaris 8 STED (Leica Biosystems).

## 9. Paradigmas comportamentales

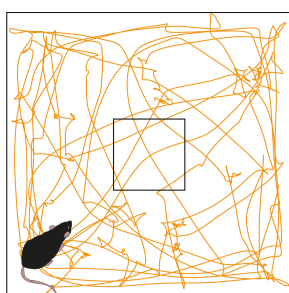
Los experimentos de comportamiento se realizaron con ratones C57BL/6 silvestres y tratados con Cort, estos últimos empezaron los experimentos 3 días después de finalizar el tratamiento. Los 5 días previos al inicio de los experimentos, los animales fueron manipulados durante 5-10 min, con el fin de habituarlos al experimentador. El día de inicio de cada experimento, las jaulas de los ratones se trasladaron a la sala de realización de los test, al menos 30 min antes del inicio de los mismos, con el fin de reducir el estrés que supone trasladar las jaulas y lograr una habituación a las condiciones de dicha sala (semi-oscuridad, temperatura controlada). Todos los experimentos se realizaron entre las 8:00 y las 15:00 h. Las arenas y laberintos se limpiaron entre ratones y sesiones con 0,1% ácido acético disuelto en agua. El orden de las pruebas comportamentales se mantuvo para las distintas cohortes, tal y como se indica en la Figura M12.



**Figura M12. Cronograma de los paradigmas comportamentales realizados.** TC, tratamiento corticosterona. OF, *open field* (campo abierto). EPM, *elevated plus maze* (laberinto en cruz elevado). OIP, *object in place* (reconocimiento de objeto en lugar). NOR, *novel object recognition* (reconocimiento de objeto novedoso). SR, *social recognition* (reconocimiento social). FST, *force swimming test* (test de natación forzada).

### 9.1. Campo abierto

El test de campo abierto (OF) evalúa la ansiedad del animal (Carter y Shieh 2015), en función del tiempo de permanencia en el centro de una arena cuadrada (40 x 40 x 40 cm).



Se habituó a los animales a la arena durante 5 min 3 días consecutivos. El día del test, el animal se coloca en una de las esquinas de la arena y se le permite explorar libremente la misma durante 5 min. Utilizando el software Ethovision XT 7 (Noldus Information Technology, Inc.; Virginia) se midió la distancia recorrida (cm), la velocidad (cm/s), el tiempo de inmovilidad (s), el tiempo de permanencia en el centro de la arena (s, cuadrado central de 10x10 cm) y el tiempo de movimiento acumulado (s) (Figura M13).

**Figura M13. Representación del test de campo abierto.** Esquema de la arena (cuadrado exterior) y del centro de la arena (cuadrado interior) y ejemplo de trayectoria de un ratón durante la realización de esta prueba comportamental.

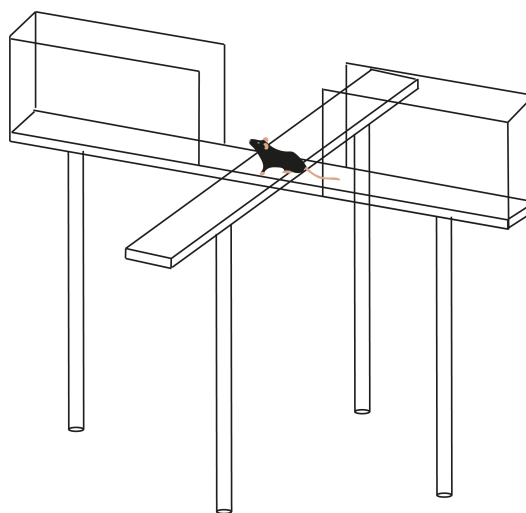
Este test se utilizó para estudiar las dinámicas de  $\text{Ca}^{2+}$  poblacionales en los astrocitos de CPFm de manera espontánea (en ausencia de objetos o animales que supongan un estímulo para el animal)



## 9.2. Laberinto en cruz elevado

El test del laberinto en cruz elevado (EPM) evalúa la ansiedad del animal, en función del tiempo, las exploraciones y las entradas que realice a los brazos abiertos con respecto a los brazos cerrados. De este modo los ratones presentarán menor ansiedad cuantas más visitas y más tiempo pasen en los brazos abiertos (Bailey y Crawley 2009). Como se puede apreciar en la Figura M14, el laberinto está compuesto por dos brazos cerrados y dos abiertos (30 x 10 x 5 cm, cada brazo) y se encuentra elevado del suelo 1 m. Al comienzo de esta prueba, el animal se deposita en la intersección de los brazos (centro del laberinto). Utilizando el software Ethovision XT 7 se registró el tiempo que el animal se encuentra en cada brazo. El índice de exploración se calculó como el tiempo que el animal se encuentra en los brazos abiertos frente al tiempo total de exploración

(tiempo en brazos abiertos + tiempo en brazos cerrados). Se consideró la existencia de una entrada cuando las cuatro extremidades del animal se encontraban sobre uno de los brazos.

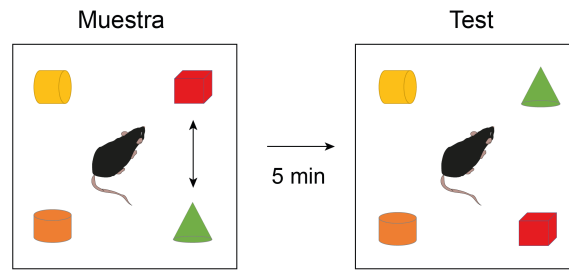


**Figura M14. Representación del laberinto en cruz elevado.** Esquema de la arena constituida por dos brazos abiertos y dos brazos cerrados.

## 9.3. Localización de objetos

El test de localización de objetos (OIP) evalúa el procesamiento cognitivo del animal mediante la medida de un tipo de memoria en la que se asocian unos objetos a unas localizaciones. Para la codificación y recuperación de dicha memoria es necesaria la interacción entre la CPFm, el hipocampo y la corteza perirrinal (Barker y Warburton 2015).

Este test consta de dos fases diferenciadas (Figura M15). Durante la fase de muestra (5 min) los animales se introducen en la misma arena en la que realizaron el test de campo abierto, a la que ya están habituados, junto con cuatro objetos distintos, posicionados cerca de cada una de las esquinas, y se les permite explorarlos libremente. Al terminar esta fase, se devuelven los animales a sus jaulas durante 5 min. Posteriormente se reintroducen a los animales en la misma arena, en la que previamente se ha intercambiado la posición de dos de los cuatro objetos, dando comienzo así a la fase de test (3 min). Durante esta fase, se analiza el tiempo que el ratón invierte explorando los objetos cuya localización ha cambiado con respecto al tiempo total de exploración, mediante el uso del software Ethovision XT 7. Se considera una exploración cuando la nariz del animal entra en contacto con los objetos. El intercambio de los objetos se modifica de forma aleatoria, para evitar cualquier posible preferencia por alguno de los objetos o por la localización de los mismos.

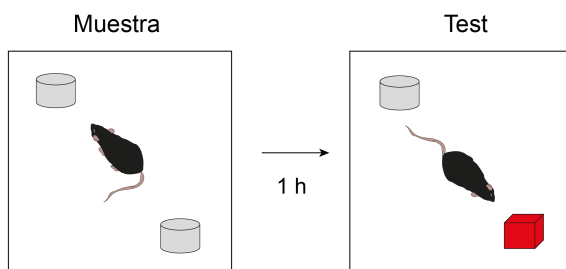


**Figura M15. Test de localización de objetos.** Esquema de las dos fases de este paradigma comportamental, en el que se muestra la localización de los cuatro objetos y el intercambio de la posición de dos de ellos durante la fase de test.

#### 9.4. Reconocimiento de objeto novedoso

El test de reconocimiento de objeto novedoso (NOR) evalúa el procesamiento cognitivo del animal mediante el desarrollo de una memoria de reconocimiento. Esta tarea comportamental se basa en la tendencia espontánea de los roedores a pasar más tiempo explorando un objeto novedoso que uno familiar (Leger et al., 2013). La elección de explorar el objeto novedoso refleja el uso de la memoria de trabajo (Leger et al., 2013). La formación y recuperación de esta memoria requiere de la actividad coordinada del hipocampo y la CPF (Wang et al., 2021a).

Esta tarea comportamental se realiza en la misma arena utilizada para el campo abierto y el test de localización de objetos, a la que los animales ya están habituados. En dicha arena hay dos objetos idénticos, colocados en diagonal, cerca de las esquinas (Figura M16). En la fase de muestra (5 min), los ratones pueden explorar libremente los dos objetos. Después de un período de una hora, da comienzo la fase de test (5 min), en la que los animales se reintroducen en la arena, en la cual uno de los objetos se ha sustituido por uno nuevo, que difiere en forma y apariencia. Se analiza el tiempo que el animal invierte explorando el objeto nuevo con respecto al tiempo total de exploración, utilizando el software Ethovision XT 7. El intercambio de uno de los objetos idénticos por uno novedoso se realiza de forma aleatoria, para evitar cualquier posible preferencia por la localización de los mismos.

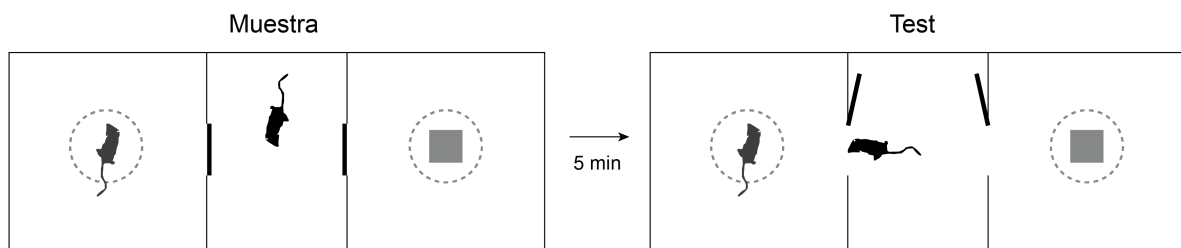


**Figura M16. Test de reconocimiento de objeto novedoso.** Esquema de las dos fases de este paradigma comportamental, en el que se muestra la localización de los dos objetos idénticos, durante la fase de muestra, y el intercambio de uno de ellos por un objeto nuevo para el animal durante la fase de test.

#### 9.5. Reconocimiento social

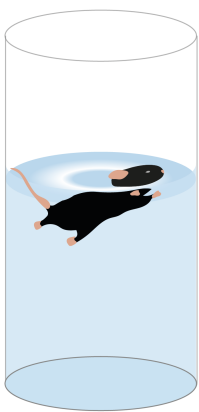
En el test de reconocimiento social (SR) se evalúa el procesamiento cognitivo social del animal. Se centra en la tendencia natural de los ratones a interactuar con otros ratones (Yang et al., 2011).

Esta tarea comportamental se realizó en una arena rectangular, compuesta por tres compartimentos (60 x 40 x 20 cm cada una) (Figura M17). En uno de los compartimentos se sitúa, dentro de una jaula redonda, un ratón (de la misma edad y sexo que el ratón que va a realizar la prueba) desconocido para el ratón que va a realizar el test (no ha tenido contacto previo con él) y en el compartimento opuesto, dentro de otra jaula igual a la anterior, un objeto neutro (bolsa de plástico negra). El ratón que va a someterse al test se introduce en la arena central, donde permanece durante 5 min. Posteriormente se abren dos puertas que dan acceso a los otros compartimentos, permitiendo al ratón que explore libremente la totalidad de la arena durante 10 min. Utilizando el software Ethovision XT 7, se cuantifica el tiempo de exploración del ratón desconocido y del objeto. Se considera una exploración cuando la nariz del ratón entra en contacto con la jaula donde se encuentra el animal o el objeto.



**Figura M17. Test de reconocimiento social.** Esquema de la arena compuesta por los 3 compartimentos y de las dos fases de este paradigma comportamental. Durante la fase de muestra el ratón permanece en la arena central. Durante la fase de test, las compuertas que cierran la arena central se abren, posibilitando que el ratón pueda interactuar con libertad con un ratón desconocido y un objeto neutro, localizados dentro de jaulas (círculo discontinuo) en las arenas laterales.

## 9.6. Natación forzada



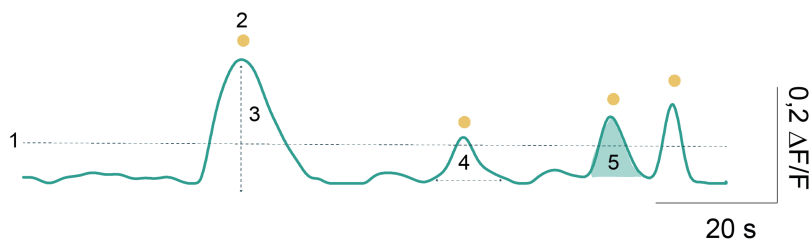
El test de natación forzada (FST) evalúa la desesperanza del animal (Porsolt et al., 1978; Bogdanova et al., 2013), en función del tiempo que permanezca inmóvil mientras se encuentra en el interior de un cilindro (29 x 12 cm) con agua (22-23 °C) (Figura M18). Se registra el comportamiento del animal durante 6 min y se analizan los últimos 4 min utilizando el software Ethovision XT 7. Se considera inmovilidad cuando el animal no mueve ninguna extremidad. El FST es una de las pruebas más comunes para estudiar estados de depresión en roedores (Bogdanova et al., 2013), por tanto, esta prueba se realizó con el fin de evaluar el comportamiento depresivo inducido por el tratamiento con Cort (Gourley y Taylor 2009; Bogdanova et al., 2013).

**Figura M18. Representación del test de natación forzada.** Esquema del cilindro de metacrilato parcialmente lleno de agua (para evitar que el ratón pueda saltar fuera del cilindro). En él, el ratón moverá sus extremidades de forma intermitente durante 6 min. De manera general durante los 2 primeros min todos los grupos de ratones presentarán un comportamiento de huida, por lo que este tiempo no se considera en el análisis. Durante los siguientes 4 min la inmovilidad se considera un reflejo de la desesperanza del animal.

## 10. Análisis de datos

### 10.1. Análisis de señales de $\text{Ca}^{2+}$ *ex vivo*

Posteriormente a la detección manual de ROIs con el software ImageJ y a la obtención del promedio de la intensidad de fluorescencia ( $F$ ) de todos los píxeles que componen cada ROI en el tiempo  $F(t)$  se utilizó un código de MATLAB personalizado<sup>1</sup> (MATLAB R2020a; Mathworks, Massachusetts) para el procesamiento posterior (modificado de Mederos et al., 2021). En primer lugar, los artefactos en la señal de fluorescencia producidos por el movimiento mecánico (definido como períodos en los que la segunda derivada de la señal fue mayor que 15  $F/s$ ) se eliminaron del análisis. A continuación, las señales se filtraron utilizando un filtro pasa-bajo (filtro Chebyshev tipo II de 4º orden, atenuación de 20 dB). Se ajustó el fotoblanqueo y se calculó el  $\Delta F/F_0 = F(t) - F_0/F_0$  (se utilizó el percentil 10 de la señal para inferir  $F_0$ ) para cada ROI. Previamente a la detección de eventos se aplicó un filtro Savitzky-Golay (1º orden, longitud de 3 puntos) para filtrar el ruido remanente que pueda quedar. Se consideró la existencia de un evento de  $\text{Ca}^{2+}$  cuando su  $\Delta F/F_0 > 2-3$  veces la varianza del ruido (definido como la media de la primera derivada de la señal) y tenían al menos  $> 3\%$  de cambio relativo (0,03). Se analizaron la frecuencia, la amplitud, el área bajo la curva y la duración para cada ROI (Figura M19).

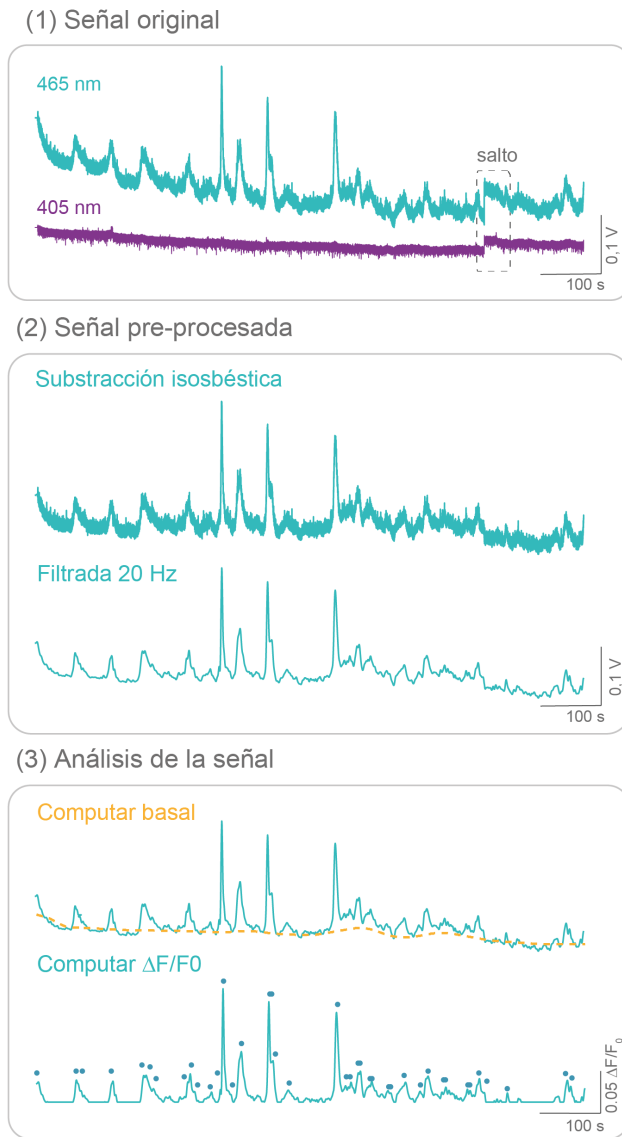


**Figura M19. Análisis de los eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  *ex vivo*.** Ejemplo de un trazo de fluorescencia  $\Delta F/F_0$  a lo largo de 2 min de registro, correspondiente a un proceso astrocitario con el indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  GCaMP6f. (1) Umbral para la detección de eventos de  $\text{Ca}^{2+}$ . Umbral detección eventos=  $\text{media}(\Delta F/F_0) + 3 \cdot \text{std} \cdot \text{media}(\text{derivada}(\Delta F/F_0))$ . (2) Eventos de  $\text{Ca}^{2+}$ . (3) Amplitud del evento de  $\text{Ca}^{2+}$ . (4) Duración del evento de  $\text{Ca}^{2+}$ . (5) Área bajo la curva del evento de  $\text{Ca}^{2+}$ .

### 10.2. Análisis de señales de $\text{Ca}^{2+}$ *in vivo*

Posteriormente a la adquisición intercalada de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  *in vivo*, para la luz azul (465 nm) y ultravioleta (405 nm), las señales se separaron y analizaron con un código de MATLAB personalizado, con una frecuencia de corte de 20 Hz y una atenuación de 20 dB. Se eliminaron saltos en la señal relacionados con la incorrecta unión del cable de fibra óptica con la fibra implantada en el animal (salto, Figura M20(1)).

<sup>1</sup> El código de MATLAB para el análisis de señales de  $\text{Ca}^{2+}$  *ex vivo* fue adaptado por Julio Esparza. El análisis de estas señales se realizó junto con Julio Esparza, miembro del laboratorio.



**Figura M20. Análisis de los eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  *in vivo*.**

Esquema de los pasos a seguir en el análisis de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  poblacionales. (1) Se muestran las señales adquiridas para el canal azul (465 nm, dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ ) y ultravioleta (405 nm, independiente de  $\text{Ca}^{2+}$ ). En ambas señales se puede apreciar la presencia de un “salto”. (2) Se realiza un pre-procesamiento de la señal, en el que se iguala y sustrae la señal de 405 nm de la señal de 465 nm, y posteriormente se filtra la señal, aplicando un filtro pasa-bajo de 20Hz. (3) Se computa el basal (línea discontinua amarilla) de la señal y posteriormente el  $\Delta F/F_0$  y se procede a la detección de eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  (reflejado con puntos azules sobre la señal de fluorescencia).

Posteriormente, se realizó un preprocesado de las señales ajustando las señales isobécticas a las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  para sustraerlas (eliminando así artefactos relacionados con el movimiento (Lerner et al., 2015; Kim et al., 2016) y se aplicó un filtro temporal pasa-bajo a las señales (ventanas de 1 s, 20 Hz) para suavizarlas (Figura M20(2)). Las señales de fluorescencia GCaMP6f se estandarizaron entre animales calculando el  $\Delta F = (F - F_0)/F_0$ , donde  $F_0$  se calculó interpolando linealmente entre los mínimos locales de la señal de fluorescencia dividiéndola en ventanas temporales (45 s).

De esta manera se consigue eliminar el fotoblanqueo de la señal (Figura M20(3)). La existencia de un evento de  $\text{Ca}^{2+}$  se definió como el período en el que la fluorescencia mostraba un máximo local ( $>2$  veces la varianza del ruido de la señal) (Wang y Delrosso 2019). Los eventos se expandieron hacia los mínimos locales más cercanos (tanto antes como después del pico), para designar el inicio y el final de los eventos putativos de  $\text{Ca}^{2+}$ . Se excluyeron los eventos cuyo valor máximo era inferior a 0,01 (1% de cambio relativo), o cuya prominencia era inferior a 0,001 (0,1%). Los eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  multi-pico, se ajustaron a una distribución Gaussiana, para inferir su duración real y el área bajo la curva.

Para las pruebas de comportamiento, en el test de campo abierto se analizaron los eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  espontáneos y se eliminaron del análisis aquellos ratones que mostraban  $<2$  eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  en dicho test. Para la prueba de reconocimiento social, el análisis se restringió a las primeras 5 exploraciones, tanto para el objeto neutro como para el ratón desconocido, para evitar el decaimiento exponencial de eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  mostrado tras varias exploraciones (Gunaydin et al., 2014). Para analizar los eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  durante las exploraciones, se seleccionaron los eventos cuyo pico se produjo desde 1 s antes del inicio de la exploración hasta 3 s después del final de la misma. Para comparar entre sujetos, las señales se transformaron en Z-score, calculando la ratio

de la señal  $\Delta F/F_0$  sobre la desviación estándar de la señal durante los primeros 5 min del test, cuando los ratones estaban en la arena central (Matthews et al., 2016). Las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  se alinearon en el tiempo, tomando los 5 s previos al inicio de la exploración y los 20 s después del inicio de la misma (ver Figura R12d).

Para descartar cualquier posible relación entre la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitaria y el movimiento de los animales, se evaluó la velocidad de los animales durante los test de campo abierto y reconocimiento social. Para el test de campo abierto, se calculó la velocidad media durante la duración de cada evento de  $\text{Ca}^{2+}$  y se ajustó a un modelo de regresión lineal, relacionando la amplitud del evento  $\text{Ca}^{2+}$  y la velocidad media (función *fitlm* de MATLAB). Para la prueba de reconocimiento social, tal y como se ha descrito anteriormente, se calculó la velocidad media asociada a cada evento de  $\text{Ca}^{2+}$ , y en este caso, sólo se consideraron para el análisis posterior los eventos asociados a las 5 primeras exploraciones (objeto y ratón). A continuación, se ajustaron a una regresión lineal por un lado los eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  asociados a las exploraciones del objeto y por otro los eventos asociados a la exploración del ratón (ver Figura R2c y R12e).

### 10.3. Análisis de la señal de 5-HT *in vivo*

Las señales de fluorescencia relacionadas con 5-HT (iSeroSnFR) o controles (eGFP) adquiridas *in vivo*, se analizaron con un código de MATLAB personalizado<sup>2</sup>, de manera similar al análisis de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  *in vivo* (ver apartado 10.2 de Materiales y métodos).

Para eliminar el fotoblanqueo inicial de la señal se descartó el primer minuto de registro. Las señales se filtraron con un filtro pasa-bajo Chebyshev tipo II con una frecuencia de corte de 30 Hz. Se calculó el  $\Delta F/F_0$  de la señal para los registros de fluorescencia correspondientes a las señales de 5-HT y controles.

Para la representación de los trazos (Figura R9e, g), las señales se filtraron con un filtro pasa-bajo con una frecuencia de corte de 20 Hz para reducir el ruido, y se calculó el Z-score para comparar entre sujetos. El análisis se limitó a las señales registradas 30 s antes (basal) y 30 s después del inicio de la estimulación.

### 10.4. Análisis histológico y de colocalización

Los análisis de colocalización se realizaron utilizando el software Fiji (ImageJ 1.53i, NIH). Se estudió la colocalización de los vectores virales (cyto-GCaMP6f y ChrimsonR-tdTom) con marcadores astrocitarios (S100 $\beta$ ), neuronales (NeuN) y serotoninérgicos (SERT)<sup>3</sup>.

<sup>2</sup> Este análisis se realizó en colaboración con Lucía Arancibia, miembro del laboratorio.

<sup>3</sup> Los análisis se realizaron en colaboración con los miembros del laboratorio la Dra. Cristina Sánchez-Puelles, el Dr. Jorge Ramírez-Franco y Andrea Sánchez-Ruiz.



Para las imágenes de GCaMP6f, se obtuvieron secciones ópticas individuales (2  $\mu\text{m}$ ), por medio de un objetivo de inmersión en aceite 40 x 1,25 NA; y para las imágenes de ChrimsonR-tdTom se obtuvieron secciones ópticas individuales (1  $\mu\text{m}$ ), por medio de un objetivo de inmersión en aceite 63 x 1,40 NA. Para un análisis cualitativo de colocalización de GCaMP6f con astrocitos y neuronas y de ChrimsonR-tdTom con el transportador para 5-HT (SERT), se obtuvieron z-stacks<sup>4</sup> (16  $\mu\text{m}$  y 10  $\mu\text{m}$  de grosor respectivamente).

Se estableció un umbral para las imágenes de GCaMP6f o ChrimsonR-tdTom y se creó una máscara. Esta máscara se superpuso sobre las imágenes correspondientes al marcador astrocitario S100 $\beta$ , al marcador neuronal NeuN o a las proyecciones serotoninérgicas marcadas con anti-SERT, y se detectaron y midieron automáticamente (imagen ChrimsonR-tdTom) o manualmente (imagen GCaMP6f) los ROIs seleccionados previamente en las máscaras. Se seleccionaron manualmente 5 ROIs de fondo en la imagen de S100 $\beta$ , NeuN y SERT. Se consideró que había colocalización cuando el valor medio de intensidad de los ROIs de S100 $\beta$ , NeuN y SERT superaba la media del fondo más 3 veces la desviación estándar de la señal. Las ROIs positivas se marcaron con 1, mientras que los ROIs negativos se marcaron con 0, y se calculó el porcentaje de ROIs positivos para cada campo de visión.

Para el estudio de la presencia del receptor para 5-HT tipo 2A (5-HT<sub>2A</sub>) en astrocitos de CPFM, se obtuvo una proyección máxima en z de 3  $\mu\text{m}$  de grosor a partir de imágenes adquiridas con un objetivo de inmersión en aceite 40 x 1,3 NA. Los somas y procesos astrocitarios se identificaron manualmente mediante el marcaje endógeno EGFP en ratones *Aldh1l1*-eGFP utilizando la herramienta ROI manager. El número de receptores localizados en los astrocitos *Aldh1l1*-eGFP se evaluó utilizando los plugin *Puncta Analyzer* y *Find Maxima*, estableciendo el valor de prominencia como la fluorescencia media de fondo más 5 veces la desviación estándar. Los astrocitos se consideraron positivos para la expresión del receptor 5-HT<sub>2A</sub> cuando se detectaron al menos 4 puntos.

## 10.5. Reconstrucción morfológica de astrocitos

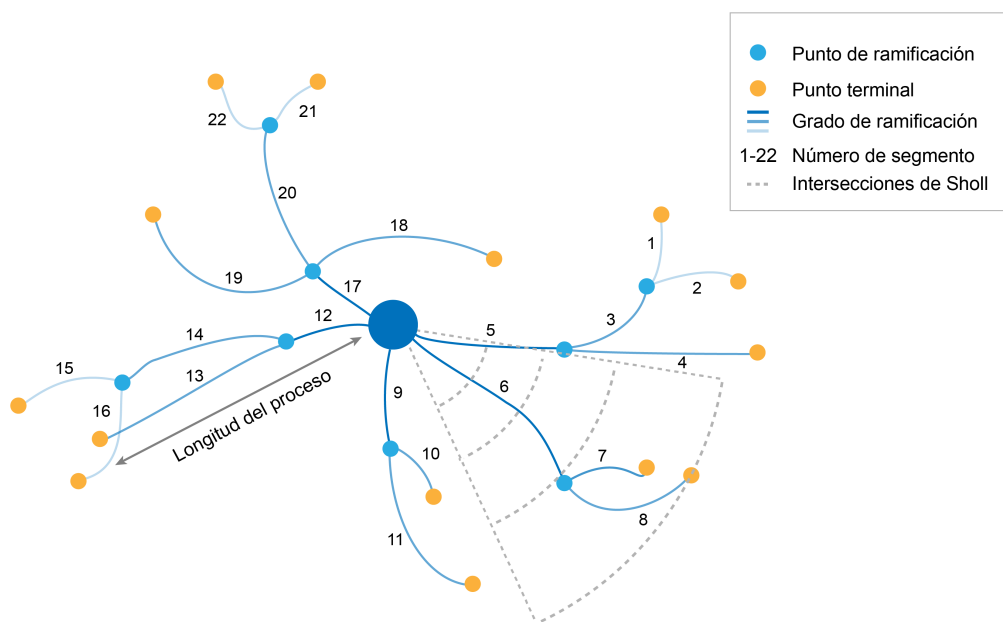
Para este estudio, los ratones *Aldh1l1*-eGFP, controles y tratados con Cort, se sometieron al test de natación forzada, seleccionándose aquellos animales que presentaron los valores más bajos (control) y más altos (Cort) de inmovilidad en el test. Las imágenes obtenidas por microscopía confocal se reconstruyeron tridimensionalmente<sup>5</sup> utilizando el software Imaris (Imaris 9.2, Oxford Instruments, Reino Unido). Se utilizaron rodajas de 70  $\mu\text{m}$  de grosor de ratones transgénicos *Aldh1l1*-eGFP. Se tomaron imágenes confocales de alta resolución de la señal de GFP con el objetivo 63x (la distancia entre cada plano era de 0,5  $\mu\text{m}$ ) y se importaron al software IMARIS 9.2. Para realizar el trazado de cada astrocito se realizó un análisis semiautomático, en el que se fijaron los siguientes parámetros: *-Largest Diameter*: 3,5  $\mu\text{m}$  (determina el diámetro máximo en un astrocito), se utiliza para especificar el diámetro del soma, que se tomará como punto de inicio desde el cual el astrocito se ramificará. *-Thinnest Diameter*:

<sup>4</sup> Se nombrará así al conjunto de imágenes de un plano z apiladas

<sup>5</sup> Este análisis se realizó en colaboración con los miembros del laboratorio Andrea Sánchez-Ruiz, Álvaro Bercedo y con el Dr. Miguel Fernández de la Torre

0,594  $\mu\text{m}$  (determina el diámetro mínimo en un astrocito), se utiliza para especificar el diámetro mínimo de cada punto que se utilizará para reconstruir los procesos astrocitarios. -*SeedPoints Threshold*: 5 (determina el umbral de intensidad a partir del cual se va a seleccionar un número de puntos para reconstruir el astrocito), se utiliza para especificar la sensibilidad en la detección de los distintos procesos de un astrocito, *Dendrite Diameter Threshold*: 0,900  $\mu\text{m}$  (determina el umbral a partir del cual se calcula el diámetro de la forma de los procesos del astrocito).

Una vez reconstruido el astrocito (Figura M21), se analizaron los parámetros recogidos en la Tabla 3.



**Figura M21. Representación de la reconstrucción y análisis morfológico de astrocitos.** Esquema de la reconstrucción de un astrocito con el software IMARIS 9.2. Mediante los números y los distintos tipos de colores de los círculos y de líneas se indican los parámetros morfológicos analizados.

Parámetro Imaris	Descripción del parámetro
<b>Longitud del proceso (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	Distancia media de los procesos de cada astrocito
<b>Grado de ramificación</b>	Número de veces que un mismo proceso principal se divide
<b>Puntos de ramificación</b>	Número de veces en los que un proceso se divide en dos
<b>Número de segmentos</b>	Promedio del número de segmentos que hay en un proceso
<b>Puntos terminales</b>	Número de procesos
<b>Volumen</b>	Suma del espacio tridimensional ocupado por todos los segmentos de un astrocito
<b>Área (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	Suma de las áreas de todos los segmentos de los procesos
<b>Intersecciones de Sholl</b>	Número de ramificaciones de procesos que confluyen con circunferencias concéntricas de radio creciente (1 $\mu\text{m}$ ) que nacen del soma del astrocito

**Tabla 3. Variables analizadas en relación con la morfología del astrocito**

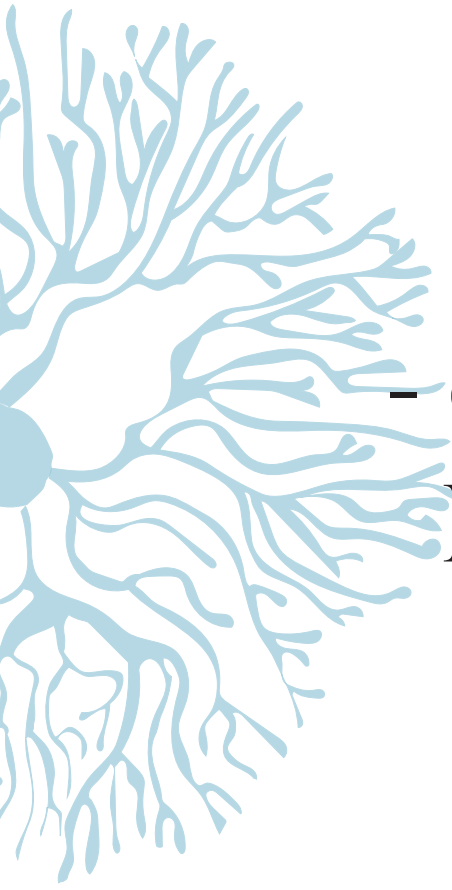


## 10.6. Procedimientos estadísticos

Todas las muestras de animales y el número de réplicas biológicas de este estudio se ajustaron a los estándares reportados en la literatura para cada método. Todos los datos presentados en este trabajo se obtuvieron a partir de réplicas experimentales; es decir, múltiples cohortes de animales de diferentes camadas, al menos tres repeticiones experimentales para cada ensayo. Los datos fueron analizados con el programa informático SigmaPlot 14.5. Los datos se expresaron como el promedio  $\pm$  el error estándar de la media (SEM, del inglés *Standard error of the mean*), indicándose en cada caso el número de datos (n), o bien en formato de diagramas de cajas y bigotes con la representación de la mediana. En estos diagramas de cajas y bigotes, la marca central indica la mediana, y los límites inferior y superior de la caja indican los percentiles 25 y 75 respectivamente. Los bigotes se extienden hasta los puntos de datos máximo y mínimo. En los diagramas de dispersión de puntos, la marca central indica la mediana, y los bordes superior e inferior, denominados rango, corresponden a los valores máximo y mínimo, respectivamente.

Los datos se analizaron utilizando test correspondientes al análisis de normalidad de las muestras y acorde al diseño experimental y la estructura de los datos adquiridos, en cada caso se indican los estadísticos empleados. De esta manera, para realizar comparaciones de dos grupos los datos se analizaron utilizando una ANOVA de una vía (post hoc, test de Dunn, test de Tukey, test de Holm-Sidak, prueba de Kruskal-Wallis) o la prueba paramétrica t de Student pareada o la prueba de Wilcoxon. En los experimentos con varias condiciones, se realizó una ANOVA de dos vías seguido de una prueba post hoc (test de Holm-Sidak). El tamaño de las muestras se determinó acorde a los valores aceptados en la literatura para cada caso (Perea et al., 2014b; Mariotti et al., 2018). Las diferencias estadísticamente significativas se representaron de la siguiente manera:  $P < 0,05(*)$ ,  $P < 0,01(**)$  y  $P < 0,001(***)$ .





# - CAPÍTULO IV - RESULTADOS

---



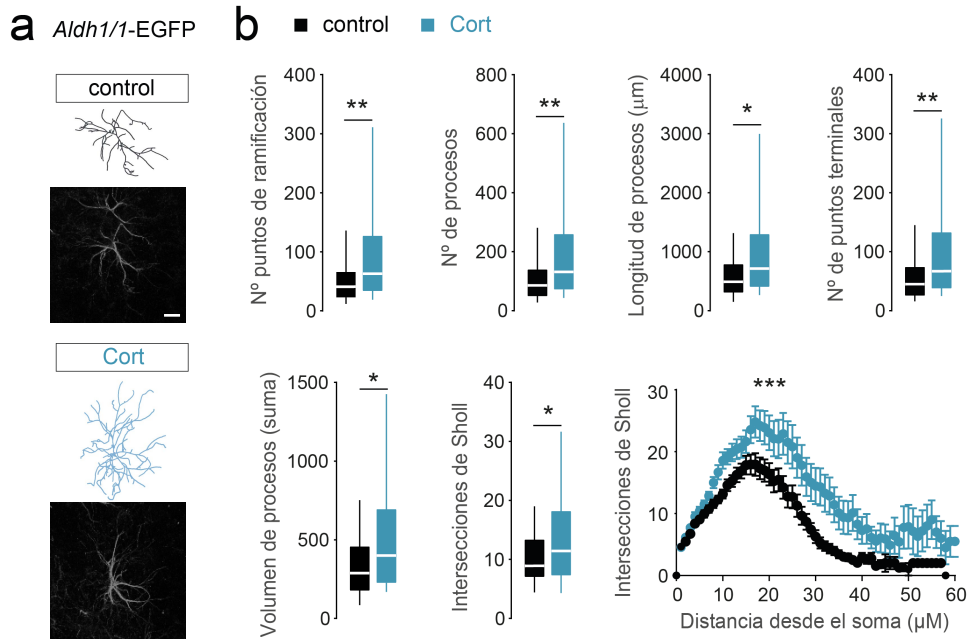
## IV. Resultados

### 1. El TD induce cambios morfológicos en los astrocitos de CPFm

Existen evidencias de cambios en la densidad y morfología de los astrocitos en pacientes con TD en distintas regiones cerebrales, como la CPFm, la corteza cingulada anterior, el hipocampo y la amígdala (Rajkowska y Stockmeier 2013; Wang et al., 2017; Machado-Santos et al., 2021; Miguel-Hidalgo 2022). Así, la expresión de marcadores específicos de astrocitos como son la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y S100 $\beta$ , está alterada en el TD, observándose niveles reducidos del primero y elevados del segundo en la CPF de pacientes que padecen esta enfermedad y en modelos murinos de depresión (Miguel-Hidalgo et al., 2000; Banasr y Duman 2008; Rajkowska y Stockmeier 2013). Sin embargo, los resultados obtenidos en estudios de reconstrucción morfológica de astrocitos de CPFm en el TD ponen de manifiesto la existencia de discrepancias en cuanto a la naturaleza de las alteraciones (Davis et al., 2002; Miguel-Hidalgo et al., 2010; Torres-Platas et al., 2011; Codeluppi et al., 2021). Algunos estudios realizados en tejido post mortem de pacientes con TD señalan que la reducción en el número de astrocitos está acompañada de una atrofia de las células (Davis et al., 2002; Miguel-Hidalgo et al., 2010; O'Leary y Mechawar 2021; Lin et al., 2023). Sin embargo, otros autores describen la presencia de una hipertrofia de los astrocitos en pacientes que sufrieron TD (Torres-Platas et al., 2011), y en modelos animales de estrés (Murphy-Royal et al., 2020; Yu et al., 2021).

Por ello, con el objetivo de evaluar el impacto del tratamiento con Cort, el modelo murino de TD usado en este estudio, en la morfología de los astrocitos de CPFm se realizó un estudio de reconstrucción morfológica basado en la expresión de GFAP. El análisis reveló que los astrocitos de CPFm de ratones Cort exhibían un mayor grado de ramificación celular, determinado por un elevado número de puntos de ramificación ( $99,30 \pm 16,14$  Cort frente a  $49,52 \pm 5,58$  control;  $n=27$  y  $n=31$  astrocitos,  $N=3$  y  $N=3$  ratones, respectivamente, prueba t de Student,  $P=0,010$ ), mayor número ( $204,67 \pm 32,90$  Cort frente a  $103,32 \pm 11,42$  control, prueba t de Student,  $P=0,010$ ) y longitud de procesos ( $1021,92 \pm 150,09$   $\mu\text{m}$  Cort frente a  $568,04 \pm 54,98$   $\mu\text{m}$  control, prueba t de Student,  $P=0,017$ ), y un mayor valor medio de intersecciones de Sholl ( $11,94 \pm 0,85$  Cort frente a  $7,47 \pm 0,77$  control, prueba t de Student,  $P<0,001$ ) en comparación con los astrocitos de ratones control (Figura R1). Paralelamente, y en línea con la hipertrofia encontrada en astrocitos de pacientes con TD (Torres-Platas et al., 2011), se observó un aumento del volumen ocupado por los procesos astrocitarios de los ratones tratados con Cort en comparación con los controles (Figura R1).

En conjunto, estos resultados sugieren que el TD inducido por Cort provoca un aumento de la complejidad anatómica de los astrocitos de la CPFm, lo que podría derivar en una función anormal de estos astrocitos en los trastornos del estado de ánimo relacionados con el TD.

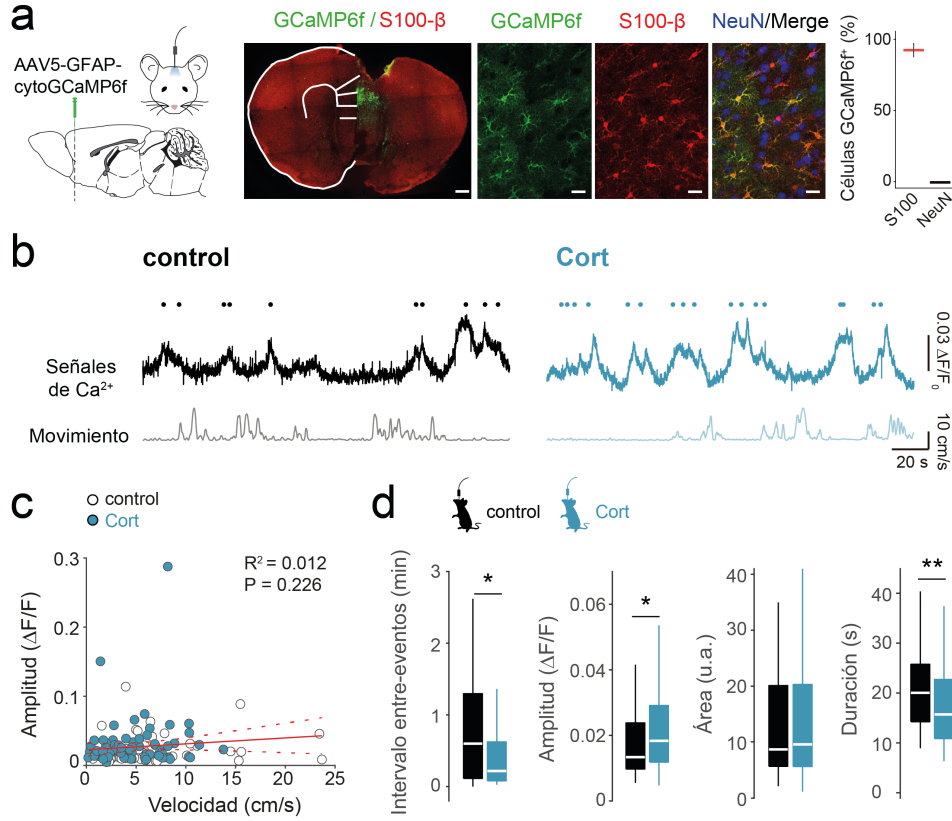


**Figura R1. Aumento de la complejidad morfológica de astrocitos de CPFm en ratones Cort.** **a)** Imagen representativa de astrocitos de CPFm reconstruidos con el software IMARIS 9.2 (arriba) a partir de imágenes confocales de astrocitos que expresan de forma endógena EGFP (abajo) en ratones control (gris) y Cort (azul). Escala: 15  $\mu\text{m}$ . **b)** El tratamiento con Cort induce una alteración de diversos parámetros que definen la morfología de los astrocitos. El número de procesos, su ramificación y longitud están aumentados en ratones Cort, resultando en un aumento del volumen de los procesos y el perfil de Sholl. La línea central en los diagramas de cajas y bigotes representa la mediana, los límites inferior y superior indican los percentiles 25 y 75, respectivamente, y los bigotes se extienden hasta los datos máximos y mínimos (igual para el resto de las figuras). \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

## 2. El TD altera la actividad de $\text{Ca}^{2+}$ en astrocitos de CPFm

Para evaluar el impacto del tratamiento de Cort sobre la fisiología de los astrocitos de CPFm se estudiaron las dinámicas de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular como indicador de actividad celular. La actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos se estudió tanto a nivel poblacional como a nivel de célula individual. Para abordar el estudio de la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  a nivel poblacional, se inyectaron ratones con virus adenoasociados que contenían la construcción genética GFAP-GCaMP6f, y se implantó una fibra óptica en CPFm en ratones control y tratados con Cort. Mediante la utilización de un sistema de fotometría de fibra (LED 465 nm para excitar la fluorescencia GCaMP6f y 405 nm para medir la señal isobéptica) se monitorizó la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  mientras los ratones se movían libremente en un campo abierto, al que habían sido previamente habituados. Como resultado, los ratones Cort mostraron señales de mayor amplitud ( $0,03 \pm 0,004 \Delta F/F_0$  Cort frente a  $0,02 \pm 0,003 \Delta F/F_0$  control; 90 eventos Cort,  $N=6$ ; 60 eventos control,  $N=7$ ; ANOVA de una vía, post hoc test de Dunn,  $P= 0,047$ ), con eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  más rápidos que los ratones control ( $17,39 \pm 0,81$  s Cort frente a  $20,57 \pm 0,95$  s control; ANOVA de una vía, post hoc test de Dunn,  $P= 0,007$ ), dando lugar a una reducción del intervalo entre eventos ( $0,53 \pm 0,08$  min Cort frente a  $0,88 \pm 0,12$  min control; ANOVA de una vía, post hoc test de Dunn,  $P=0,017$ ) (Figura R2).

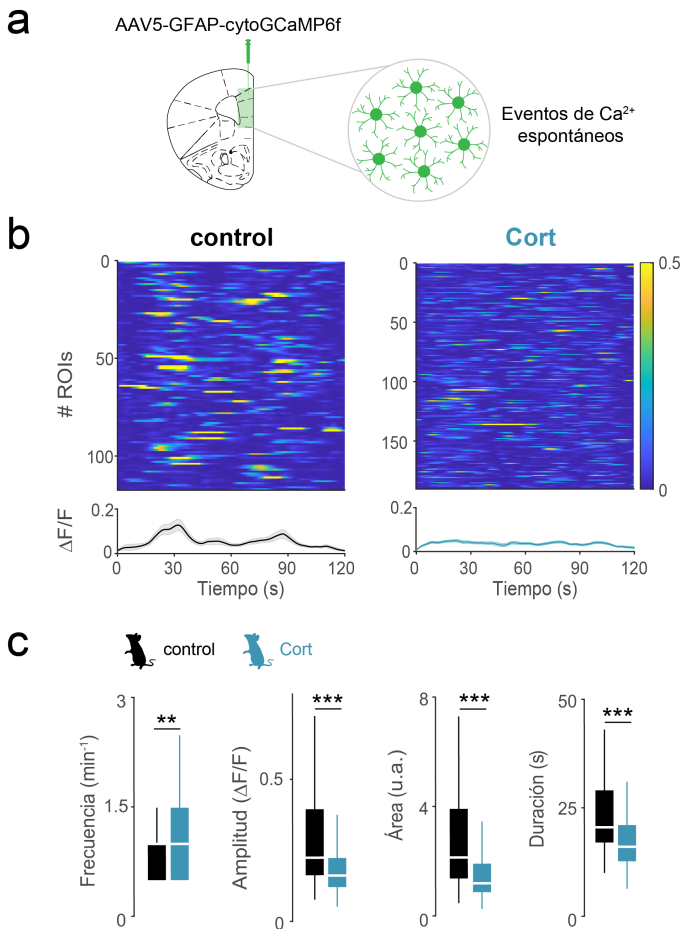
Cabe destacar que la aparición de estas señales de  $\text{Ca}^{2+}$  fueron independientes del movimiento del ratón en el campo abierto, no encontrándose una correlación significativa entre la amplitud de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  y la velocidad del animal ( $R^2=0,012$ ,  $P=0,226$ ) (Figura R2c).



**Figura R2. Alteración de las dinámicas de  $\text{Ca}^{2+}$  poblacionales en ratones Cort durante la exploración de un campo abierto.** **a)** Izda, representación esquemática de la implantación de fibra óptica en la CPFm y expresión viral selectiva de GCaMP6f (verde) en astroцитos (S100β, rojo) de CPFm. Escala: 500μm. Dcha, imágenes de microscopía confocal mostrando la expresión de GCaMP6f, el marcaje con S100β y la colocalización con el marcador neuronal NeuN. Escala: 20μm. Porcentaje de células positivas para GCaMP6f que colocalizan con el marcaje de S100β y NeuN (162 células positivas para GCaMP6f, 3 rodajas, 3 ratones; ANOVA de una vía, test de Tukey,  $P < 0,001$ ). **b)** Trazos representativos de la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  en astroцитos y del movimiento de los ratones correspondientes a los registros de fotometría *in vivo* durante las exploraciones en un campo abierto, para ratones control y Cort. Los círculos sobre los trazos indican el pico máximo de los eventos de  $\text{Ca}^{2+}$ . **c)** Relación entre la amplitud de la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  en astroцитos y la velocidad media de los ratones control y Cort durante el test de campo abierto. **d)** Análisis de las dinámicas de  $\text{Ca}^{2+}$  a nivel poblacional en ratones control (N=7) y Cort (N=6). ANOVA de una vía, test de Dunn,  $P > 0,05$ ,  $P < 0,05$ , 0,01. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ .

Para verificar la existencia de alteraciones en las dinámicas de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitario a nivel de célula individual, se realizaron registros de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  en rodajas de cerebro de capa 2/3 de CPFm, usando la misma estrategia viral descrita para los registros poblacionales. Para aislar la respuesta endógena de astroцитos en ratones control y Cort, estos registros se realizaron en presencia de tetrodotoxina, una toxina que bloquea selectivamente canales de  $\text{Na}^+$  (Perea y Araque, 2005b), para reducir la contribución neuronal derivada de potenciales de acción. De este modo, el análisis de la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  en los compartimentos subcelulares seleccionados

(ROIs) mostró la existencia de diferencias significativas entre astrocitos de ratones control y ratones Cort, en línea con los resultados obtenidos en los registros *in vivo*. Los astrocitos de los ratones Cort mostraron una mayor frecuencia de eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $1,03 \pm 0,04 \text{ min}^{-1}$  Cort frente a  $0,85 \pm 0,04 \text{ min}^{-1}$  control; 190 ROIs Cort, N=2; 117 ROIs control, N= 3; ANOVA de una vía, post hoc test de Dunn,  $P= 0,006$ ), que fueron más rápidos ( $17,33 \pm 0,45 \text{ s}$  Cort frente a  $22,95 \pm 0,77 \text{ s}$  control, ANOVA de una vía, post hoc test de Dunn,  $P< 0,001$ ) y de menor amplitud en comparación a los astrocitos de los ratones control ( $0,19 \pm 0,01 \Delta F/F_0$  Cort frente a  $0,36 \pm 0,03 \Delta F/F_0$  control; ANOVA de una vía, post hoc test de Dunn,  $P< 0,001$ ) (Figura R3).



Por tanto, estos datos sugieren que el tratamiento con Cort, además de inducir alteraciones morfológicas, (ver Figura R1), provoca una disfunción en la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos de CPFm, tanto a nivel de célula individual como a nivel poblacional.

**Figura R3. Alteración de las dinámicas de  $\text{Ca}^{2+}$  a nivel de célula individual en ratones Cort.** **a)** Representación de la inyección viral de AAV5-GFAP-GCaMP6f en la CPFm seguido del posterior registro de eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  espontáneos en astrocitos. **b)** Gráfico representativo de la actividad espontánea de los ROIs y de la actividad promedio en astrocitos de ratones control (negro, n=117 ROIs, N=3 ratones) y Cort (azul, n=190 ROIs, N=2 ratones), el código de intensidad de color denota cambios de fluorescencia. Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM. **c)** Dinámicas de los eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  espontáneos en astrocitos de ratones control y Cort. \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$ .

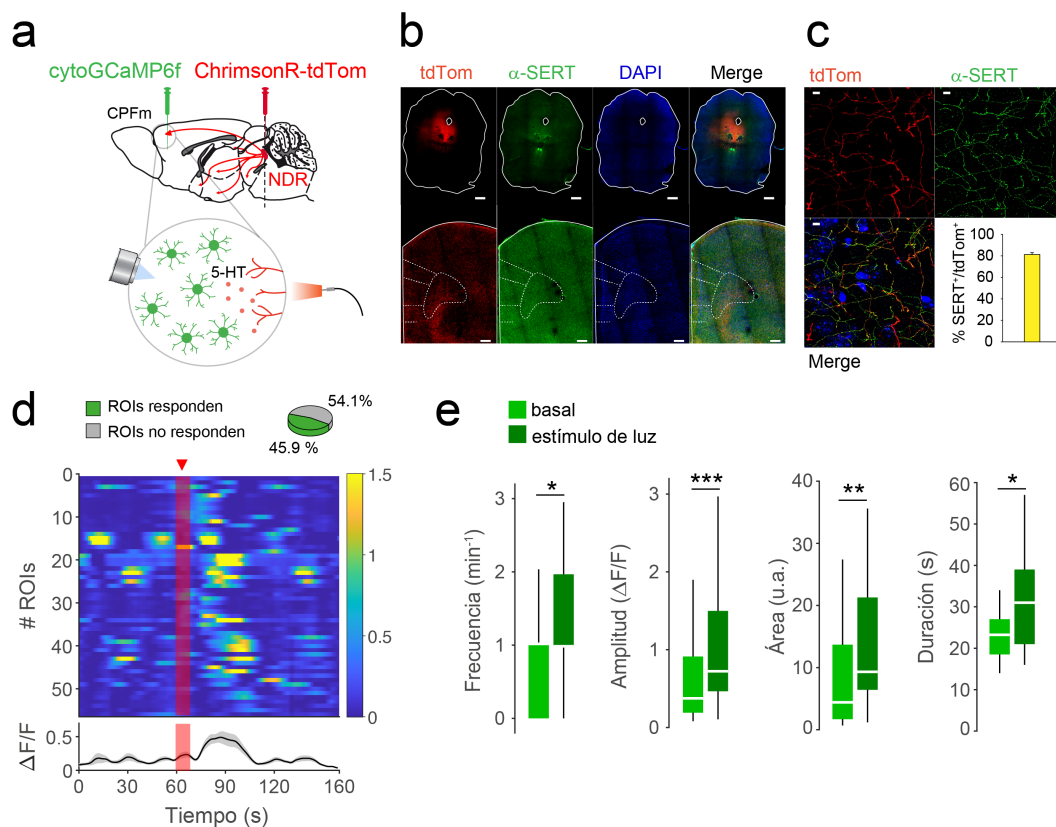
### 3. Los astrocitos de CPFm son sensibles a la señalización por 5-HT

Los astrocitos pueden monitorizar la actividad sináptica mediante la expresión de receptores para múltiples neurotransmisores y neuromoduladores (Perea y Araque 2005a; Perea et al., 2009; Volterra et al., 2014; Araque et al., 2014). Entre los neuromoduladores cabe destacar la importancia de 5-HT y su relevancia en la regulación de procesos fisiológicos como el procesamiento sensorial, la cognición o los estados emocionales (Charnay y Leger 2010; Berumen et al., 2012; Janet et al., 2023). Los astrocitos expresan transportadores y receptores para detectar la transmisión serotoninérgica en distintas áreas cerebrales, incluyendo la CPFm, siendo ésta una de las regiones con mayor inervación serotoninérgica (Celada et al., 2013;



Chandler et al., 2013). Sin embargo, se dispone de un conocimiento limitado acerca del impacto de la señalización serotoninérgica sobre la fisiología del astrocito, así como de su contribución en el TD.

Por ello, se propuso verificar si los astrocitos de CPFm podían responder a las aferencias serotoninérgicas procedentes del NDR y, por tanto, ser dianas de esta señalización. Se utilizaron estrategias virales descritas anteriormente para expresar de forma selectiva el sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos de CPFm, y la opsina excitadora ChrimsonR (AAV9-hSyn-ChrimsonR-tdTom, excitación en el rango de la luz roja del espectro, con un pico máximo en 590 nm) (Klapoetke et al., 2014) en las neuronas del NDR (Figura R4a), con el fin de estimular la liberación local de 5-HT en la CPFm. Mediante técnicas inmunohistoquímicas se comprobó que la expresión de la opsina en CPFm estaba presente de forma mayoritaria en fibras serotoninérgicas ( $81,26 \pm 1,72\%$ ) (Figura R4b, c). Posteriormente, se realizaron registros de la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  *ex vivo* en ratones control y se pudo constatar que el 45,9% de los astrocitos registrados en la CPFm mostraron respuestas de  $\text{Ca}^{2+}$  tras la estimulación optogenética de las aferencias del NDR (pulsos de luz continua de 640-660 nm, 10s, <1mW) (Figura R4d, e).



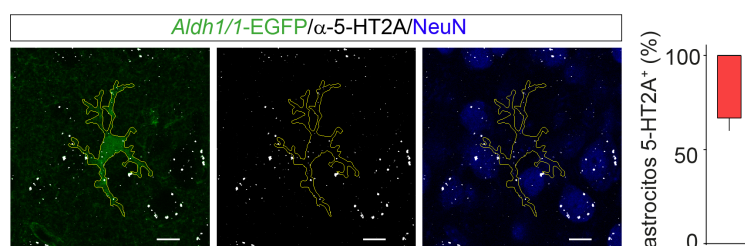
**Figura R4. Los astrocitos de CPFm responden con oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  a la liberación endógena de 5-HT por parte de las proyecciones serotoninérgicas del NDR.** a) Representación de las inyecciones virales de AAV9-hSyn-ChrimsonR-tdTom en el NDR y AAV5-GFAP-GCaMP6f en CPFm. El círculo muestra un aumento de la CPFm en el que se representa la estimulación optogenética de las proyecciones del NDR (fibras rojas) que llegan a CPFm y el registro de imagen de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos. b) Inmunohistoquímica mostrando la expresión de AAV9-hSyn-ChrimsonR-tdTom (rojo),  $\alpha$ -SERT (verde) y DAPI (azul) en rodajas de cerebro del NDR (arriba) y de CPFm (abajo).

Escala: 500  $\mu\text{m}$ . **c)** Colocalización exitosa de tdTom y  $\alpha$ -SERT en rodajas de cerebro de CPFm. **d)** Gráfico representativo de la actividad de los ROIs y de la actividad promedio de astrocitos que responden a la estimulación optogenética de las aferencias del NDR (barra y triángulo rojos;  $n=56$  ROIs de 122; 45,9%,  $N=2$  ratones). El código de intensidad de color denota cambios de fluorescencia. Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM. **e)** Dinámicas de los eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos en respuesta a la liberación endógena de 5-HT. \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$ .

De esta manera, se confirmó que la actividad serotoninérgica del NDR puede estimular la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos de la CPFm (Figura R4).

A continuación, se estudió qué receptores para 5-HT estaban involucrados en la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  de los astrocitos de CPFm. En astrocitos de roedores y humanos se ha descrito la expresión de los receptores 5-HT<sub>1A-1F</sub>, 5-HT<sub>2A-2C</sub>, 5-HT<sub>6</sub>, y 5-HT<sub>7</sub> en distintas áreas cerebrales (Hirst et al., 1997, 1998; Berumen et al., 2012; Li et al., 2012). Cabe destacar que los receptores 5-HT<sub>2A-2C</sub> están ligados a proteínas  $\text{G}\alpha_q$ , cuya activación desencadena la vía de señalización de inositol trifosfato (IP3) (Hagberg et al., 1998; Wu et al., 1999; Li et al., 2010), induciendo una elevación de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares (Srinivasan et al., 2015) y activando la proteína quinasa C. Dado que esta ruta intracelular se ha descrito como una de las vías principales en la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos (Holtzclaw et al., 2002; Fiacco y McCarthy 2004; Navarrete et al., 2012; Sherwood et al., 2021) se evaluó si la estimulación con 5-HT podía activarla en astrocitos de CPFm.

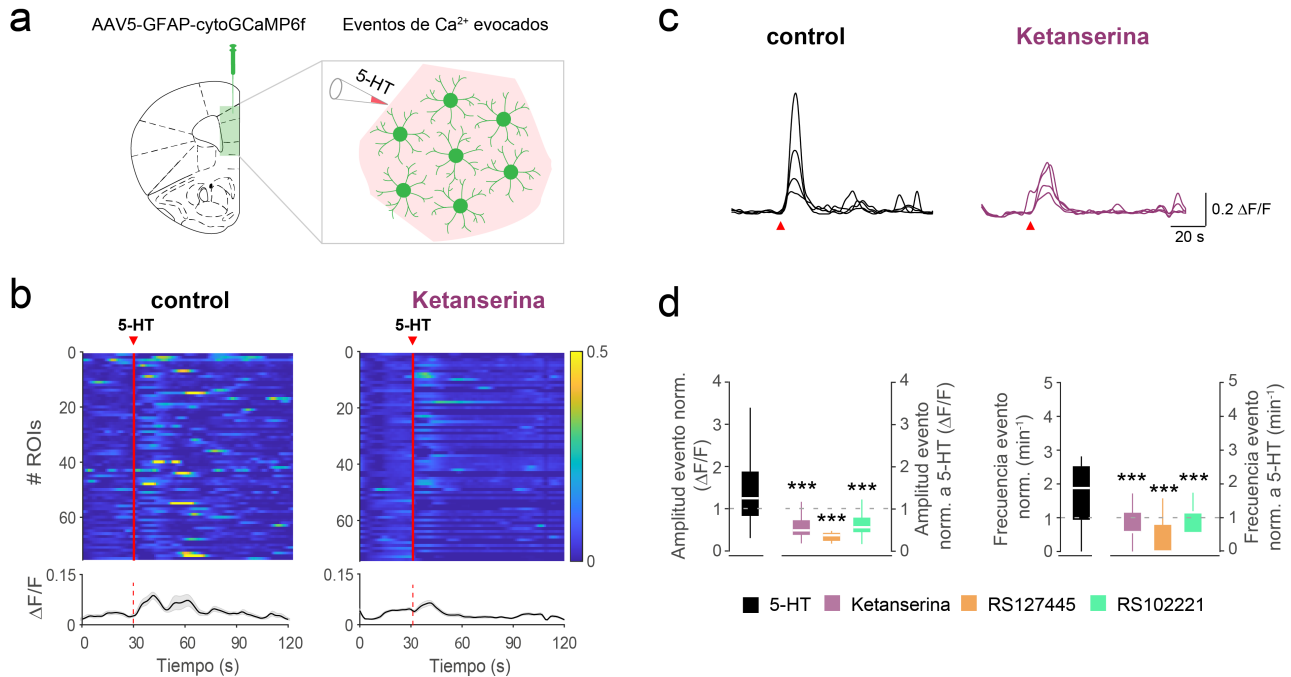
En primer lugar, se confirmó la expresión de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> en astrocitos de CPFm, utilizando ratones *Aldh1l1*-eGFP como modelo animal ya que los astrocitos expresan una sonda fluorescente verde de forma endógena, favoreciendo su identificación. El análisis inmunocitoquímico reveló que el  $90,11 \pm 4,10\%$  de los astrocitos presentaban marcaje para receptores 5-HT<sub>2A</sub> ( $n=83$  astrocitos,  $N=2$ ) (Figura R5).



**Figura R5. Expresión del receptor 5-HT<sub>2A</sub> en astrocitos de CPFm.** Izda, inmunocitoquímica representativa mostrando un astrocito que expresa EGFP (verde), el marcaje del receptor 5-HT<sub>2A</sub> (blanco) y del marcador neuronal NeuN (azul). Escala: 10  $\mu\text{m}$ . Dcha, porcentaje promedio de astrocitos 5-HT<sub>2A</sub> positivos ( $n=83$  astrocitos, 3 rodajas, 2 ratones).

Posteriormente, se estudió si la activación selectiva de estos receptores inducía respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos tras la estimulación con 5-HT. Utilizando las estrategias virales ya descritas para monitorizar  $\text{Ca}^{2+}$ , en rodajas *ex vivo* de CPFm se registraron las respuestas de los astrocitos tras la estimulación de 5-HT mediante un pulso de presión (1 mM; 10 s, 1 bar). De esta manera, se comprobó que la estimulación local con 5-HT inducía un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en los astrocitos (Figura R6a,b), similar a la estimulación endógena con optogenética (Figura R4d,e).

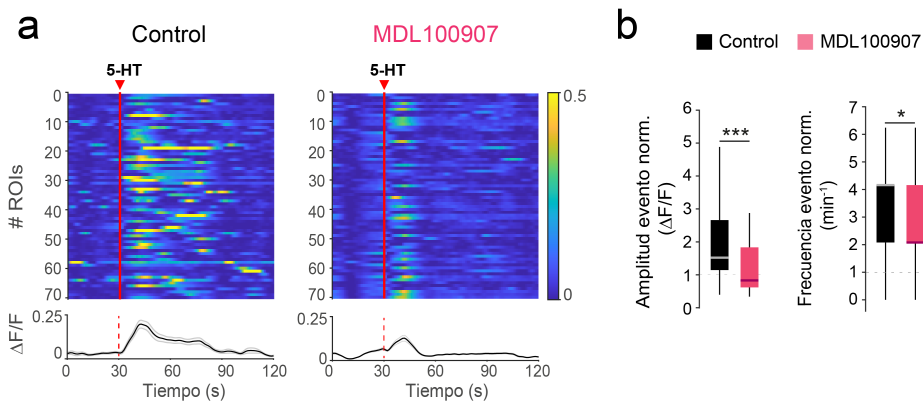
En presencia de antagonistas específicos para los diferentes subtipos de la familia de receptores 5-HT<sub>2</sub> (ketanserina para 5-HT<sub>2A</sub>, RS127445 para 5-HT<sub>2B</sub> y RS102221 para 5-HT<sub>2C</sub>) se observó una reducción significativa tanto de la amplitud como de la frecuencia de los eventos de Ca<sup>2+</sup> evocados tras la estimulación aguda con 5-HT (Figura R6b-d), confirmando la participación de estos receptores en la respuesta astrocitaria.



**Figura R6. La activación de los receptores 5-HT<sub>2</sub> promueve la señalización de Ca<sup>2+</sup> en astrocitos.** **a)** Representación de la inyección viral de AAV5-GFAP-GCaMP6f en la CPFm seguido del posterior registro de eventos de Ca<sup>2+</sup> evocados por la aplicación local de 5-HT en astrocitos. **b)** Gráfico representativo de la actividad basal y evocada por 5-HT de los ROIs y de la actividad promedio de astrocitos en condiciones control (izda) y en presencia de ketanserina (dcha) (n=75 ROIs, N=2 ratones). El código de intensidad de color denota cambios de fluorescencia. Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM. **c)** Trazos representativos de la actividad de Ca<sup>2+</sup> en astrocitos inducida por la aplicación local de 5-HT (triángulo rojo), en condiciones control (izda, negro) y tras la perfusión de ketanserina (dcha) en el LCA. **d)** Diagramas de cajas y bigotes representando cambios en la amplitud y frecuencia de eventos de Ca<sup>2+</sup> inducidos por 5-HT antes (negro) y después de la aplicación en el LCA de los antagonistas de la familia de receptores 5-HT<sub>2</sub> (ketanserina 10  $\mu$ M, morado; RS127445 1  $\mu$ M, naranja, n=70 ROIs, N=2; RS102221 1  $\mu$ M, verde, n=69 ROIs, N=2). La amplitud y frecuencia de eventos de Ca<sup>2+</sup> inducidos por 5-HT (cajas negras) fueron normalizados con respecto a la actividad previa a la estimulación con 5-HT. La amplitud y frecuencia de eventos de Ca<sup>2+</sup> inducidos por 5-HT en presencia de Ketanserina, RS127445 y RS102221 (cajas moradas, naranjas y verdes, respectivamente) fueron normalizados con respecto a la actividad de Ca<sup>2+</sup> evocada por 5-HT en condiciones control. Nótese la reducción de la actividad de Ca<sup>2+</sup> en presencia de cada antagonista. ANOVA de una vía, post hoc test de Dunn, \*\*\*P<0,001.

Ketanserina es un fármaco que presenta afinidad por los receptores 5-HT<sub>2A</sub>, pero también por los 5-HT<sub>2C</sub> (Kristiansen y Dahl 1996; Erkizia-Santamaría et al., 2022). Para evaluar sin ambigüedades el impacto de la activación de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> en la respuesta de Ca<sup>2+</sup> de los astrocitos se realizaron experimentos de Ca<sup>2+</sup> en presencia del antagonista selectivo para los receptores 5-HT<sub>2A</sub>, MDL100907 (1  $\mu$ M; 70 ROIs control, N=2) (Figura R7). Estos resultados

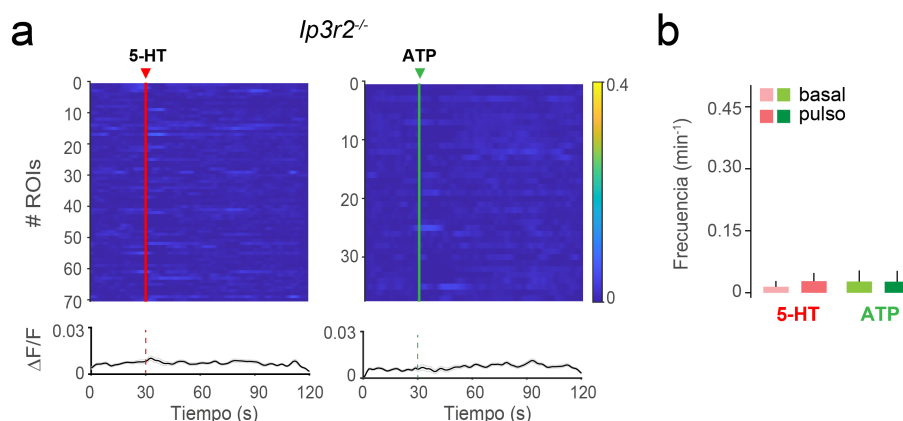
demonstraron que la estimulación serotoninérgica de astrocitos de CPFm involucra la activación de receptores de tipo 5-HT<sub>2A</sub>.



**Figura R7. El bloqueo selectivo de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> reduce la señalización de Ca<sup>2+</sup> en astrocitos. a)** Gráfico representativo de la actividad basal y evocada por 5-HT de los ROIs y de la actividad promedio de astrocitos en condiciones control (izda) y en presencia de un antagonista selectivo para el receptor 5-HT<sub>2A</sub> (MDL100907, n=70 ROIs, N=2 ratones) (dcha). El código de intensidad de color denota cambios de fluorescencia. Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM. **b)** Diagramas de cajas y bigotes representando cambios en la amplitud y frecuencia de eventos de Ca<sup>2+</sup> inducidos por 5-HT antes (negro) y después de la aplicación en el LCA de MDL100907 (rosa) en ratones control. Los valores se normalizaron con respecto a la actividad espontánea antes de la estimulación. Nótese la reducción en la amplitud y frecuencia en presencia de MDL100907. Prueba t de Student pareada,  $P < 0,05$ . \* $P < 0,05$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

Para comprobar que esta señalización de Ca<sup>2+</sup> inducida por 5-HT requería la activación de la vía PLC-IP3, se evaluó dicha respuesta en ratones deficientes para el receptor IP3 tipo 2, *Ip3r2*<sup>-/-</sup> (Li et al., 2005). En línea con resultados previos (Srinivasan et al., 2015; Agarwal et al., 2017), tanto en condiciones de reposo como tras la estimulación con 5-HT los astrocitos de ratones *Ip3r2*<sup>-/-</sup> mostraron una señalización de Ca<sup>2+</sup> disminuida ( $0,014 \pm 0,014$  min<sup>-1</sup> basal frente a  $0,028 \pm 0,020$  min<sup>-1</sup> pulso, 70 ROIs control, N= 2; prueba t de Student pareada,  $P = 1,000$ ) (Figura R8). Este resultado apoya la participación de la vía de señalización por IP3R2 en la respuesta de Ca<sup>2+</sup> evocada por 5-HT como resultado de la activación de los receptores 5HT<sub>2</sub>.

Como control de la utilidad del modelo transgénico, se realizaron en paralelo experimentos estimulando con ATP (1mM, 10s, 1 bar), un potente inductor de elevaciones de Ca<sup>2+</sup> en los astrocitos (Cotrina et al., 2000), y se observó que también se obtenían respuestas de Ca<sup>2+</sup> disminuidas en los astrocitos de ratones *Ip3r2*<sup>-/-</sup> ( $0,027 \pm 0,027$  min<sup>-1</sup> basal frente a  $0,027 \pm 0,027$  min<sup>-1</sup> pulso, 37 ROIs control, N= 2; prueba t de Student pareada,  $P = 1,000$ ) (Figura R8).



**Figura R8. 5-HT estimula la activación de la vía IP3 en astrocitos de CPFm. a)** Gráfico representativo de la actividad basal y evocada por 5-HT (izda) y ATP (dcha) de los ROIs y de la actividad promedio de astrocitos cargados con la sonda Fluo-4 AM en ratones *Ip3r2<sup>-/-</sup>* (n=70 y n=37 ROIs, respectivamente N=2 ratones). El código de intensidad de color denota cambios de fluorescencia. Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM. **b)** Gráfico de barras que representa la frecuencia de eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos antes (basal) y después de la aplicación del pulso de 5-HT o ATP. Nótese la ausencia de un aumento de los eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  después de los estímulos. Prueba t de Student pareada,  $P=1,000$  (5-HT),  $P=1,000$  (ATP). Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM.

## 4. El tratamiento con Cort induce una reducción en la liberación de 5-HT

El trastorno depresivo se ha asociado a bajas concentraciones de 5-HT en diferentes áreas cerebrales (Sachs et al., 2015; Underwood et al., 2018; Wisłowska-Stanek et al., 2021). Por lo tanto, se evaluó si los animales tratados con Cort mostraban también niveles reducidos de 5-HT en la CPFm, lo que reforzaría el uso de este tratamiento para inducir estados depresivos en roedores.

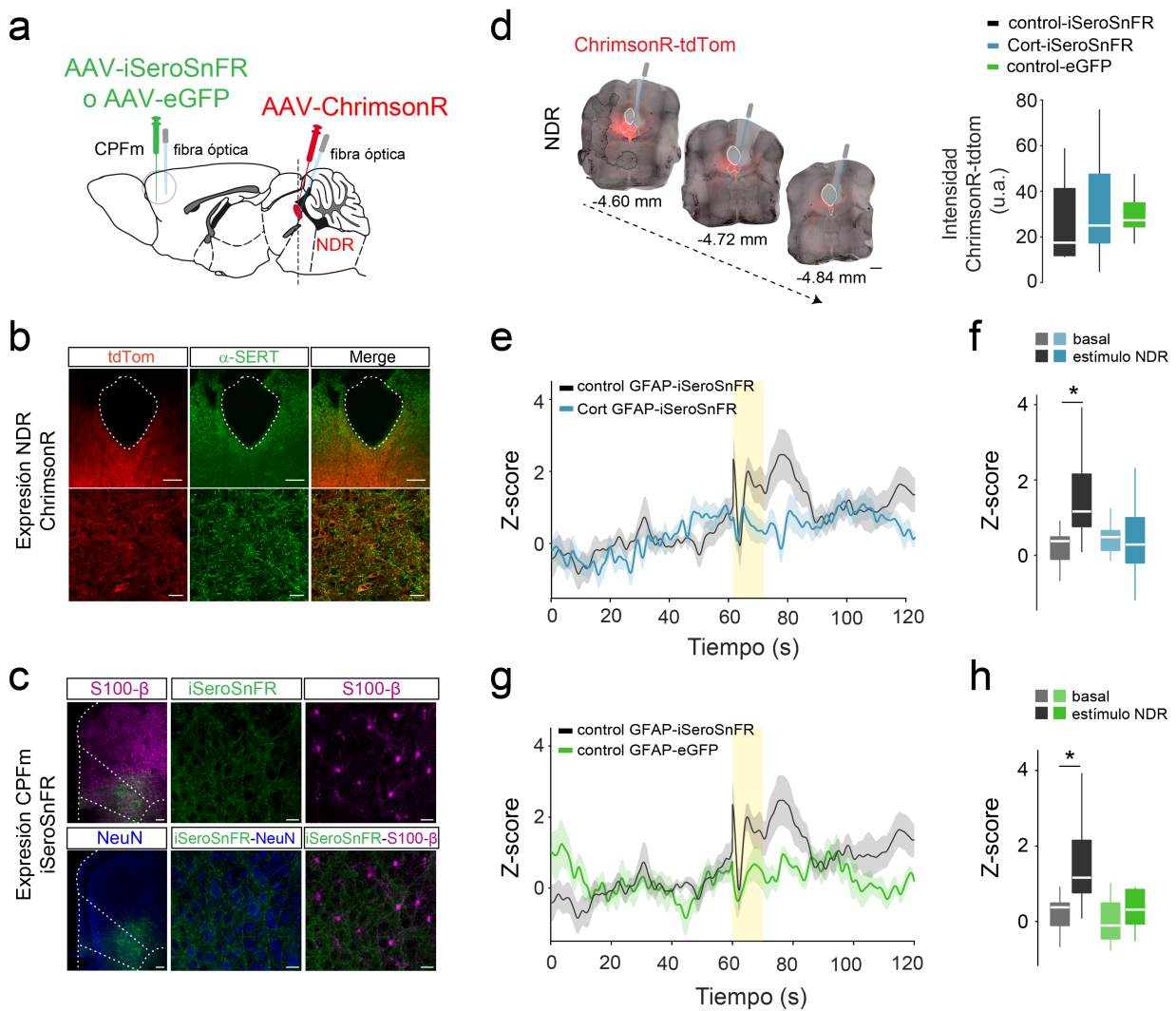
Con el fin de estimular la liberación endógena de 5-HT en CPFm y evaluar la capacidad de los astrocitos para percibirla se realizaron registros *in vivo*. Se utilizó el sensor de 5-HT iSeroSnFR (Unger et al., 2020), que fue expresado selectivamente en astrocitos de CPFm, tanto en ratones control como Cort, y de este modo, se pudo monitorizar mediante cambios en los niveles de fluorescencia del sensor la presencia de 5-HT en el medio extracelular. Se emplearon estrategias virales combinando AAV5-GFAP-mCherry-cre + AAV5-CAG-flex-iSeroSnFR para la expresión selectiva de iSeroSnFR en los astrocitos de CPFm, y AAV9-hSyn-ChrimsonR-tdTom para la expresión de una opsina excitadora en las neuronas del NDR (Figura R9a). Para la detección de fluorescencia del sensor iSeroSnFR en astrocitos de CPFm y para la estimulación de las neuronas del NDR se utilizó un sistema de fotometría de fibra con dos LED (465 nm para la excitación del sensor y 590 nm para la estimulación optogenética), implantando para ello una fibra óptica en cada una de las regiones cerebrales (ver Materiales y métodos, apartados 3.2 y 6).

En estos experimentos, la fotoestimulación de las neuronas del NDR (40 Hz, 10 s) indujo un aumento de la fluorescencia de iSeroSnFR en la CPFm de ratones control (de  $0,22 \pm 0,18$  a  $1,56 \pm 0,35$ , n=3 ratones; ANOVA de una vía, post hoc test de Holm-Sidak,  $P=0,010$ ); mientras



que los ratones Cort mostraron señales de fluorescencia atenuadas en respuesta a la estimulación del NDR ( $0,33 \pm 0,25$  en ratones Cort frente a  $1,56 \pm 0,35$  en ratones control,  $N_{\text{Cort}}=3$ ,  $N_{\text{control}}=3$  ratones; ANOVA de una vía, post hoc test de Holm-Sidak,  $P=0,006$ ) (Figura R9 e-h).

En conjunto, estos datos no sólo apoyan la hipótesis de que el comportamiento tipo depresivo está relacionado con un nivel reducido de 5-HT (Underwood et al., 2018; Wisłowska-Stanek et al., 2021), sino que en línea con los registros de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  (ver Figura R4) confirman la capacidad de los astrocitos para detectar la actividad serotoninérgica en las áreas de proyección de los núcleos serotoninérgicos.

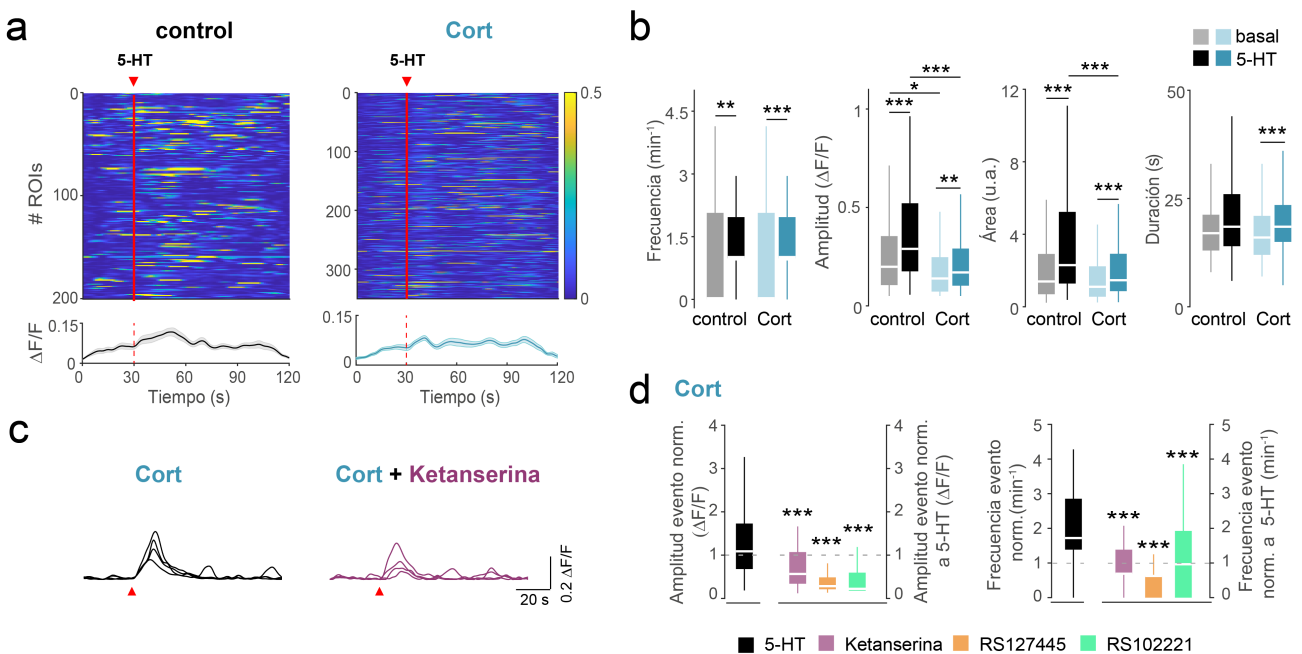


**Figura R9. Los ratones Cort muestran niveles reducidos de 5-HT en CPFm tras la activación de las neuronas del NDR.** **a)** Representación de las inyecciones virales de AAV5-GFAP-mcherry-cre, AAV5-CAG-flex-iSeroSnFR y AAV5-GFAP-eGFP en la CPFm, y de AAV9-hSyn-ChrimsomR-tdTom en el NDR, mostrando la implantación de fibra óptica en ambas áreas. **b)** Imágenes confocales mostrando la colocalización de AAV9-hSyn-ChrimsomR-tdTom (rojo) y  $\alpha$ -SERT (verde) en el NDR. Escala: 100  $\mu\text{m}$  (arriba), 20  $\mu\text{m}$  (abajo). **c)** Colocalización inmunohistoquímica de iSeroSnFR (verde) y S-100 $\beta$  (rosa) en CPFm. Escala: 100  $\mu\text{m}$  (izda), 20  $\mu\text{m}$  (dcha). **d)** Izda, secciones de cerebro mostrando la expresión de AAV9-hSyn-ChrimsomR-tdTom en el eje rostro-caudal del NDR. Escala,

500  $\mu\text{m}$ . Dcha, cuantificación de la intensidad de fluorescencia de ChrimsonR-tdTom en el NDR de ratones control GFAP-iSeroSnFR (negro), Cort GFAP-iSeroSnFR (azul) y control GFAP-eGFP (verde). Obsérvese que no hay diferencias significativas en la intensidad de expresión de ChrimsonR-tdTom, ANOVA de una vía,  $P=0,693$ . **e,g**) Trazos promedio de registros de fotometría en astrocitos de CPFm en respuesta a la estimulación con luz (barra amarilla, 590 nm, 10s, 40 Hz,) del NDR en ratones control GFAP-iSeroSnFR (gris), Cort GFAP-iSeroSnFR (azul) y ratones control GFAP-eGFP (verde). Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM (áreas sombreadas). **f,h**) Diagramas de cajas y bigotes que representan el promedio de fluorescencia 30 s antes (basal) y 30 s después (estímulo NDR) del inicio de la estimulación en ratones control GFAP-iSeroSnFR (13 ensayos,  $N=3$  ratones), Cort GFAP-iSeroSnFR (20 ensayos,  $N=3$  ratones) y ratones control GFAP-eGFP (11 ensayos,  $N=3$  ratones). Nótese que el aumento en la amplitud de eventos de 5-HT en control GFAP-iSeroSnFR después de la estimulación del NDR ( $P=0,010$ ), no se observó en ratones Cort GFAP-iSeroSnFR ni control GFAP-eGFP ( $P=0,758$ ;  $P=0,234$  respectivamente). ANOVA de una vía, post hoc test de Holm-Sidak,  $*P < 0,05$ .

## 5. La señalización de $\text{Ca}^{2+}$ inducida por 5-HT en astrocitos está alterada en el TD

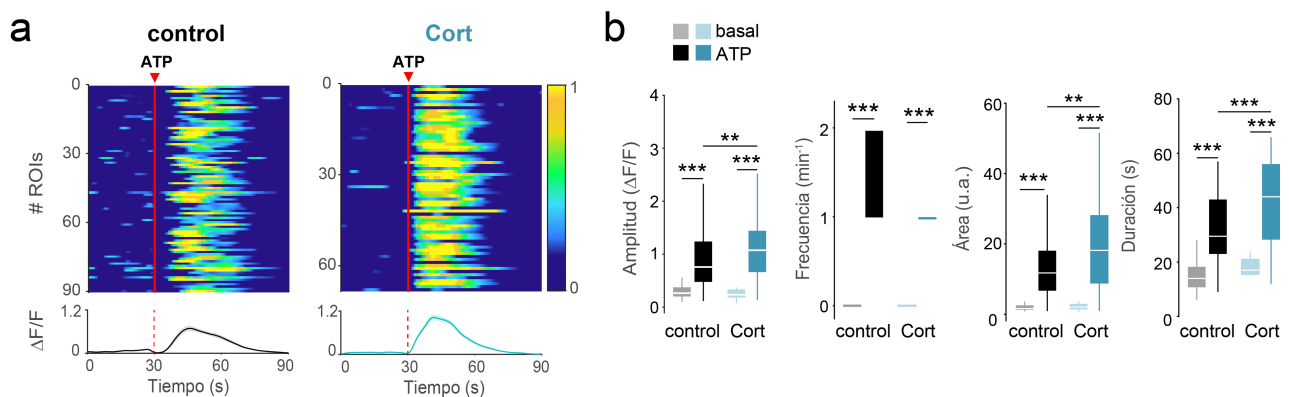
Considerando la alteración del sistema serotoninérgico en el TD (Mann 1999; Celada et al., 2013; Chandler et al., 2013; Lin et al., 2023) y tras el tratamiento con Cort (Figura R9), se propuso investigar las respuestas de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidas por 5-HT en astrocitos de ratones Cort. Siguiendo el paradigma experimental descrito anteriormente (ver apartado 3), el análisis de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  *ex vivo* reveló que los astrocitos de animales Cort presentaban una reducción, en términos de amplitud ( $0,28 \pm 0,02 \Delta\text{F}/\text{F}_0$  Cort frente a  $0,40 \pm 0,03 \Delta\text{F}/\text{F}_0$  control; ANOVA de una vía, post hoc test de Dunn,  $P < 0,001$ ) y área ( $2,99 \pm 0,27$  u.a. Cort frente a  $4,15 \pm 0,40$  u.a. control; ANOVA de una vía, post hoc test de Dunn,  $P < 0,001$ ), de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  evocadas por 5-HT con respecto a los astrocitos de ratones control (Figura R10). Además, se confirmó que la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por 5-HT en ratones Cort requiere de la participación de la familia de receptores 5-HT<sub>2</sub>, al igual que en los ratones control.



**Figura R10. La señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos inducida por 5-HT está alterada en ratones Cort.** **a)** Gráfico representativo de la actividad basal y evocada por 5-HT de los ROIs y de la actividad promedio de astrocitos en ratones control ( $n=200$  ROIs,  $N=3$  ratones) (izda) y Cort ( $n=350$  ROIs,  $N=2$  ratones) (dcha). El código de intensidad de color denota cambios de fluorescencia. Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM. **b)** Dinámicas de los eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  evocados por 5-HT en astrocitos de ratones control y Cort. Obsérvese la reducción en la amplitud y el área de los eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  en ratones Cort (cajas azul oscuro frente a cajas negras). ANOVA de una vía, post hoc test de Dunn,  $P<0,001$ . **c)** Trazos representativos de la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos inducida por la aplicación local de 5-HT (triángulo rojo), en condiciones control (izda, negro) y tras la perfusión de ketanserina (dcha) en el LCA en ratones Cort. **d)** Diagramas de cajas y bigotes representando cambios en la amplitud y frecuencia de eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidos por 5-HT antes (negro) y después de la aplicación en el LCA de los antagonistas de la familia de receptores  $5\text{-HT}_2$  (ketanserina  $10\text{ }\mu\text{M}$ , morado,  $n=47$  ROIs,  $N=2$ ; RS127445  $1\text{ }\mu\text{M}$ , naranja,  $n=70$  ROIs,  $N=2$ ; RS102221  $1\text{ }\mu\text{M}$ , verde,  $n=51$  ROIs,  $N=2$ ). La amplitud y frecuencia de eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidos por 5-HT fueron normalizados con respecto a la actividad espontánea previa a la estimulación con 5-HT (cajas negras). La amplitud y frecuencia de eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidos por 5-HT en presencia de Ketanserina, RS127445 y RS102221 (cajas moradas, naranjas y verdes, respectivamente) fueron normalizados con respecto a la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  evocada por 5-HT en condiciones control. Nótese la reducción de la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de cada antagonista. ANOVA de una vía, post hoc test de Dunn,  $*P<0,05$ ,  $**P<0,01$ ,  $***P<0,001$ .

A continuación, se quiso explorar si la alteración de la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por este tratamiento podía involucrar a otros neurotransmisores, además de 5-HT. En esta línea, y tomando en consideración estudios previos (Cao et al., 2013) se analizó el efecto de ATP sobre los astrocitos de CPFm en ratones Cort. ATP tiene la capacidad de inducir aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que pueden propagarse intercelularmente como una onda de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de uniones tipo gap, favoreciendo así la comunicación entre astrocitos (Cotrina et al., 2000; Scemes y Giaume 2006), y en condiciones de estrés o depresión se ha descrito una alteración de la señalización purinérgica en estas células (Cao et al., 2013; Rial et al., 2016; Jun et al., 2018).

Así, se realizaron registros de la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  *ex vivo* en respuesta a la estimulación con ATP mediante pulsos de presión ( $1\text{ mM}$ ,  $10\text{ s}$ ,  $1\text{ bar}$ ). Como resultado, y a diferencia de los resultados obtenidos con 5-HT, ATP indujo una respuesta exacerbada, con un aumento de la amplitud, área y duración de los eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos de ratones Cort con respecto a los ratones control ( $1,17 \pm 0,08\text{ }\Delta\text{F}/\text{F}_0$  ratones Cort frente a  $0,89 \pm 0,05\text{ }\Delta\text{F}/\text{F}_0$  ratones control; ANOVA de una vía, post hoc test de Dunn,  $P=0,006$ ;  $19,24 \pm 1,48\text{ u.a.}$  ratones Cort frente a  $13,17 \pm 0,91\text{ u.a.}$  ratones control; ANOVA de una vía, post hoc test de Dunn,  $P=0,002$ ;  $41,37 \pm 1,84\text{ s}$  ratones Cort frente a  $33,01 \pm 1,37\text{ s}$  ratones control; ANOVA de una vía, post hoc test de Dunn,  $P<0,001$ ) (Figura R11).





**Figura R11. Los astrocitos de ratones Cort muestran una señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  aumentada en respuesta a ATP. a)** Gráfico representativo de la actividad basal y evocada por ATP de los ROIs y de la actividad promedio de astrocitos cargados con la sonda Fluo-4 AM en ratones control (n=90 ROIs, N=2 ratones) (izda) y Cort (n=68 ROIs, N=2 ratones) (dcha). El código de intensidad de color denota cambios de fluorescencia. Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM. **b)** Dinámicas de los eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  evocados por ATP en astrocitos de ratones control y Cort. ATP aumenta la amplitud, área y duración de los eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  en ratones Cort con respecto a ratones control. ANOVA de una vía, post hoc test de Dunn,  $P=0,006$ ,  $P=0,002$ ,  $P<0,001$ , respectivamente.  $^{**}P<0,01$ ,  $^{***}P<0,001$ .

Estos resultados sugieren que el tratamiento con Cort produce una disfunción en la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitario en ratones Cort que no solo afecta al sistema serotoninérgico, sino que también puede involucrar a otros como el purinérgico. Por tanto, la reducción en la magnitud de las respuestas de  $\text{Ca}^{2+}$  espontáneas o inducidas por 5-HT observadas en ratones Cort no se deberían a déficits en la capacidad de los astrocitos para aumentar sus niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, y sí a la variabilidad en sus respuestas frente a diferentes estímulos en el TD.

## 6. El TD altera las dinámicas de $\text{Ca}^{2+}$ en astrocitos durante el reconocimiento social

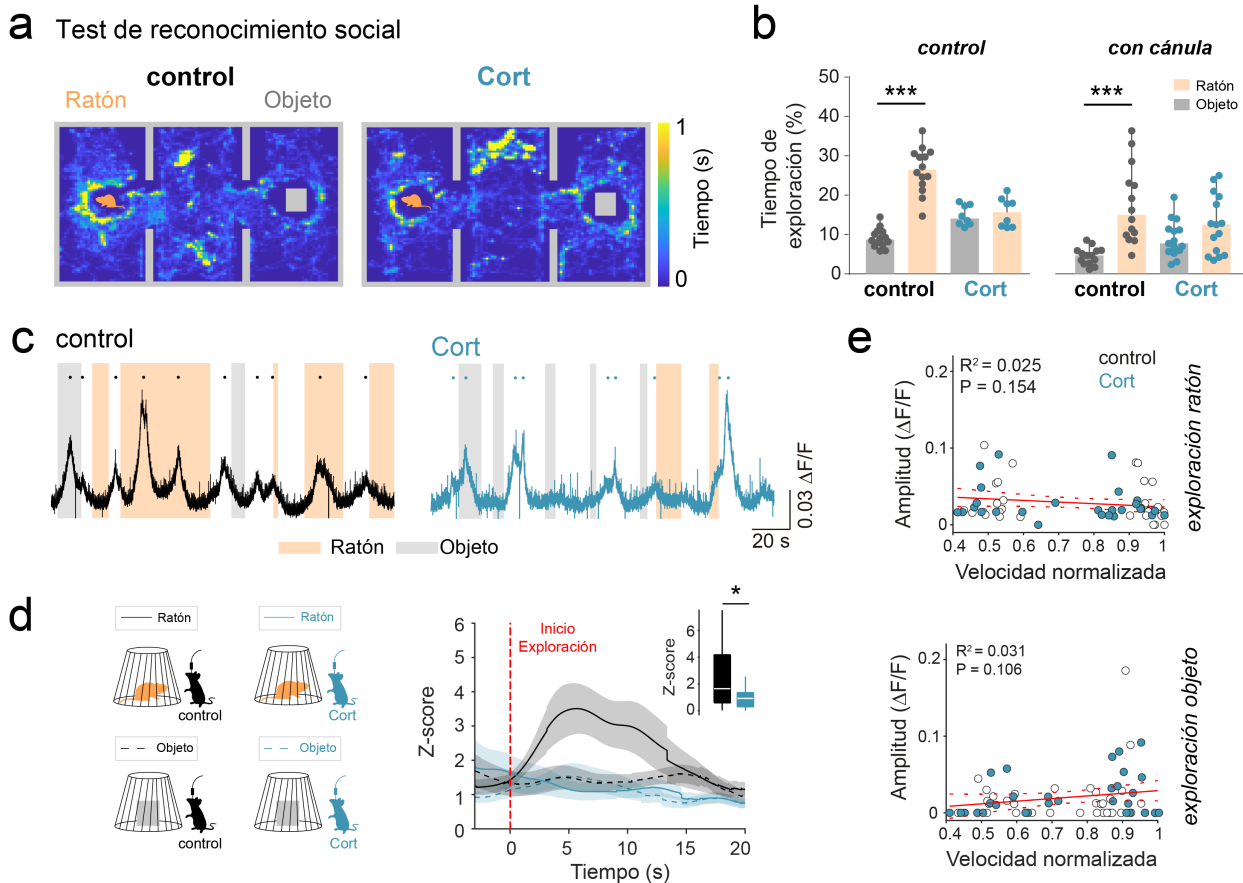
Una vez descrita la existencia de una disfunción de la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitario en rodajas de CPFm de ratones Cort, se quiso investigar las dinámicas de  $\text{Ca}^{2+}$  *in vivo* durante una tarea comportamental fuertemente vinculada con el TD. Estudios previos han demostrado que el TD tiene un importante impacto en las habilidades sociales y la forma de relacionarnos con los demás (Steger y Kashdan 2009; Weightman et al., 2014), lo que también ha sido descrito en modelos animales (Boyko et al., 2019; Elmer y Stadtfeld 2020). En primer lugar, se confirmó la presencia de una alteración en el comportamiento social de los ratones Cort. El test de reconocimiento social puso de manifiesto que los ratones Cort carecían de la preferencia social que presentan de forma natural los roedores, ya que invirtieron un tiempo similar en la exploración de un animal desconocido y un objeto ( $15,67 \pm 1,32\%$  exploración<sub>ratón</sub>,  $14,84 \pm 0,91\%$  exploración<sub>objeto</sub>, ANOVA de una vía, post hoc test de Dunn,  $P = 0,254$ ) (Figura R12b), confirmando que el modelo de Cort usado en este estudio reproduce las alteraciones sociales del TD.

Posteriormente, utilizando un sistema de fotometría de fibra se monitorizaron las dinámicas de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitario mientras los animales realizaban el test de reconocimiento social. Empleando la estrategia viral descrita en el apartado 2 (expresión selectiva de GCaMP6f en astrocitos de CPFm) y mediante la implantación de fibra óptica en CPFm en ratones control y Cort, se analizaron los eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  que coincidían con la exploración del ratón y el objeto. Los resultados mostraron que los ratones Cort tenían una actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  reducida durante la exploración del ratón en comparación con el grupo control ( $1,12 \pm 0,23$  Cort frente a  $3,26 \pm 0,69$  control, n =26 eventos, n =34 eventos, N=6, N= 7 ratones respectivamente; ANOVA de una vía, post hoc test de Dunn,  $P= 0,031$ ) (Figura R12). En cambio, los eventos registrados durante las exploraciones del objeto fueron similares en ambos grupos ( $1,42 \pm 0,36$  Cort frente a  $1,38 \pm 0,26$  control, n=29 eventos, n =35 eventos respectivamente, ANOVA de una vía, post hoc test de Dunn,  $P= 0,471$ ). En cuanto a la capacidad de interacción social de los ratones implantados con fibra óptica, se confirmó que los ratones Cort no mostraban preferencia social ( $12,52 \pm 1,92\%$

exploración<sub>ratón</sub>  $8,91 \pm 1,20\%$  exploración<sub>objeto</sub>, ANOVA de una vía, post hoc test de Dunn,  $P=0,609$ ) (Figura R12b), al contrario de los controles, asegurando así que la implantación de la cánula no alteraba la correcta ejecución del test.

De la misma manera que para el análisis de la monitorización de  $\text{Ca}^{2+}$  durante el test de exploración de un campo abierto, se comprobó si la presencia de estas señales de  $\text{Ca}^{2+}$  estaban relacionadas con el movimiento del ratón. No se encontró una correlación significativa entre la amplitud de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  y la velocidad del animal (exploración<sub>ratón</sub>  $R^2=0,025$ ,  $P=0,154$ ; exploración<sub>objeto</sub>  $R^2=0,031$ ,  $P=0,106$ ) (Figura R12e), descartándose que los eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos estuvieran relacionados directamente con el movimiento del animal. Además, estos resultados sugerían cómo los astrocitos, a través de su señal de  $\text{Ca}^{2+}$ , podían codificar el valor de la exploración, mostrando aumentos más relevantes durante las exploraciones a un ratón desconocido que a un objeto (Figura R12d).

Estos resultados apuntan a que el TD induce un fuerte impacto en el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en los astrocitos de CPFm relacionados con comportamientos de interacción social.



**Figura R12. La señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos está alterada durante la interacción social en ratones Cort.**

**a)** Mapas representativos de actividad ilustrando el tiempo de exploración dentro de la arena para ratones control y Cort durante la realización del test de reconocimiento social (SR). El código de colores denota el tiempo acumulado. **b)** Análisis del comportamiento de preferencia social en ratones control y Cort, ambos implantados con una cánula de fibra óptica (con cánula; controles = 14, Cort = 15), y ratones sin manipulaciones quirúrgicas (control; controles= 14, Cort = 8). Nótese que la implantación de la cánula no alteró la preferencia social y que los ratones

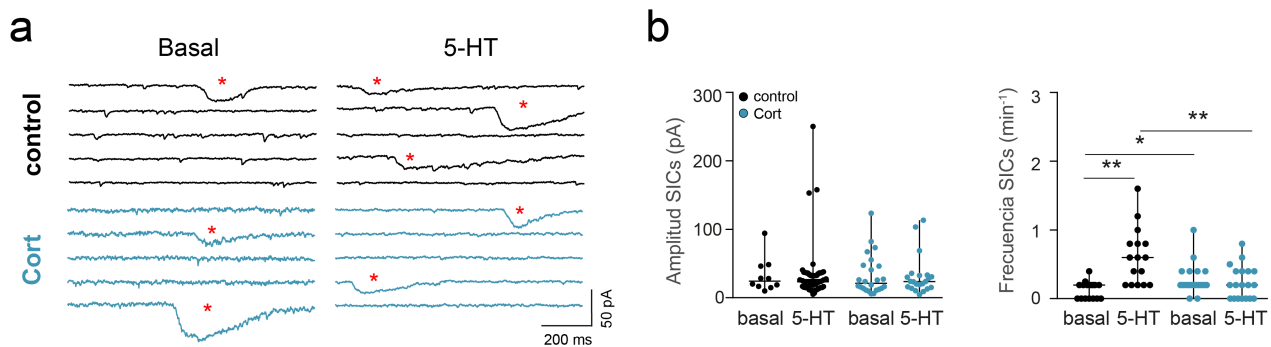
Cort no mostraron preferencia por la interacción social. ANOVA de dos vías, test de Holm-Sidak.  $P > 0,05$ . El eje Y representa el tiempo dedicado a explorar el ratón desconocido (naranja) o el objeto (gris). **c)** Trazos representativos de la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos registrados mediante fotometría *in vivo* en ratones control y Cort durante el test de SR. Las áreas sombreadas indican episodios de interacción con el ratón desconocido (naranja) o el objeto (gris), y los círculos sobre los trazos indican el pico máximo de los eventos de  $\text{Ca}^{2+}$ . **d)** Z-score de la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitaria durante la exploración del ratón desconocido (línea continua) y del objeto (línea discontinua) para ratones control ( $n=34$  eventos,  $N = 7$ , negro) y Cort ( $n=26$  eventos,  $N = 6$ , azul). Los eventos se alinearon con el inicio de la exploración. Se observó una reducción en la amplitud de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la interacción con el ratón desconocido en los ratones Cort, ANOVA de una vía, test de Dunn,  $P = 0,031$ . **e)** Relación entre la amplitud de la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos y la velocidad normalizada de los ratones control y Cort durante la exploración del ratón desconocido ( $n= 34$  ensayos control,  $n=27$  ensayos Cort) y el objeto ( $n= 35$  ensayos control,  $n=30$  ensayos Cort) en el test de SR.  $R^2$ : coeficiente de determinación,  $P$ :  $P$  valor para la pendiente diferente de 0 derivado de un modelo de regresión lineal. Las líneas discontinuas muestran el intervalo de confianza del 95% del ajuste lineal.  $*P < 0,05$ ,  $***P < 0,001$ .

## 7. 5-HT estimula la gliotransmisión en astrocitos de capa 2/3 de CPFm

La señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos se ha asociado con la liberación de gliotransmisores por parte de estas células (Bezzi y Volterra, 2001), como son glutamato, GABA, D-serina, ATP, Ado, TNF  $\alpha$ , L-lactato o prostaglandinas, entre otros (Pascual et al., 2005; Perea y Araque 2007; Henneberger et al., 2010; Santello et al., 2012; Yoon y Lee 2014). Estos gliotransmisores tienen un impacto tanto funcional como estructural en la sinapsis, y contribuyen en último término al funcionamiento de los circuitos cerebrales y al comportamiento (Risher y Eroglu 2012; Perea et al., 2014a).

Los astrocitos pueden modular la excitabilidad neuronal a través de la activación de los receptores NMDA presentes en la membrana neuronal, ya sea por liberación de glutamato y/o D-serina (Parri et al., 2001; Perea y Araque 2005b; Panatier et al., 2006; Henneberger et al., 2010; Pankratov y Lalo 2015). Se ha postulado que esta acción se realiza sobre receptores extrasinápticos (Fellin et al., 2004; D'Ascenzo et al., 2007; Shigetomi et al., 2008), produciendo corrientes lentas de entrada (SICs, en inglés *Slow Inward Currents*) que contribuyen a despolarizar las neuronas (Araque et al., 1998; Angulo et al., 2004; Fellin et al., 2004; Perea y Araque 2005b; Shigetomi et al., 2008). Por tanto, se evaluó la capacidad de los astrocitos para liberar estas sustancias estudiando la presencia de corrientes SICs en capa 2/3 de CPFm. Tanto la gliotransmisión espontánea como la inducida por 5-HT fue analizada en ratones control y Cort. Como resultado, se observó que las neuronas de ratones Cort presentaron una elevada frecuencia de SICs en condiciones basales ( $0,27 \pm 0,05 \text{ min}^{-1}$  Cort frente a  $0,13 \pm 0,03 \text{ min}^{-1}$  control; ANOVA de una vía, test de Dunn,  $P= 0,033$ ) (Figura R13). Por otro lado, la estimulación con 5-HT provocó un incremento significativo de estas corrientes SICs en neuronas de ratones control con respecto a ratones Cort ( $0,61 \pm 0,10 \text{ min}^{-1}$  control frente a  $0,24 \pm 0,05 \text{ min}^{-1}$  Cort,  $n=16$   $n=19$  SICs,  $N=2$   $N=3$  ratones respectivamente; ANOVA de una vía, test de Dunn,  $P= 0,002$ ) (Figura R13). Por tanto, la capacidad espontánea de liberar glutamato/D-serina por parte de los astrocitos parecía estar aumentada en animales Cort, y, por el contrario, tras la estimulación con 5-HT se producía una disminución en la frecuencia de estos eventos en comparación

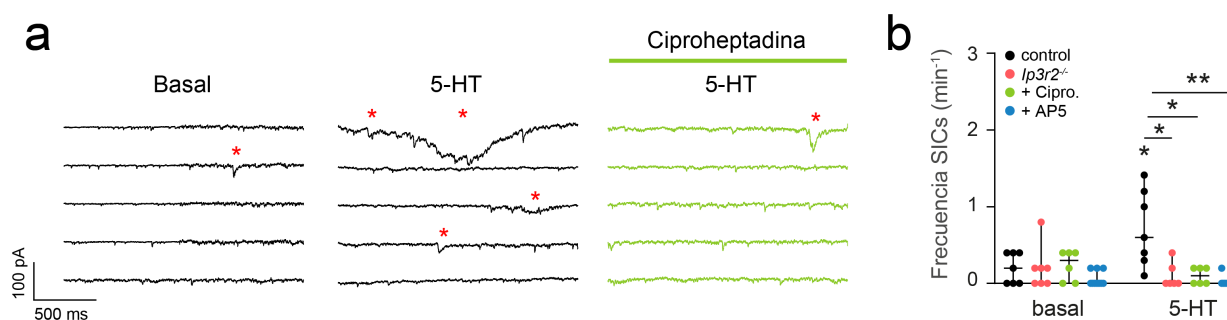
con los animales control. Estos resultados parecen estar en línea con el aumento de la frecuencia de eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  espontáneos en astrocitos (Figura R3), y con la reducción en la magnitud de las respuestas de  $\text{Ca}^{2+}$  evocadas por 5-HT en ratones Cort (Figura R10). En consecuencia, una disminución en la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitario evocada por 5-HT podría resultar en una menor liberación de glutamato/D-serina por parte de estas células.



**Figura R13. Aumento de la gliotransmisión espontánea y reducción de la evocada por 5-HT en ratones Cort.**  
**a)** Trazos representativos de SICs antes (basal) y después de la aplicación local de 5-HT (1 mM, 10 s, 1 bar) en ratones control y Cort. El asterisco rojo indica la presencia de SICs. **b)** Gráfico de dispersión de SICs registradas antes (5 min) y después de 5-HT (5 min), mostrando un aumento significativo de la frecuencia después de la estimulación con 5-HT en ratones control ( $n = 16$  células,  $N = 2$  ratones; test de Tukey,  $P < 0,001$ ), y sin cambios en la amplitud de la corriente tanto para ratones control como para Cort ( $n = 19$  células,  $N = 3$  ratones). ANOVA de una vía, post hoc test de Dunn,  $P = 0,758$  para control,  $P = 0,982$  para Cort. Nótese la frecuencia aumentada de SICs en condición de reposo (basal) para los ratones Cort, que fueron insensibles a un aumento adicional en la frecuencia tras la estimulación con 5-HT. ANOVA de una vía, post hoc test de Dunn,  $P = 0,033$ . Los datos se muestran como mediana  $\pm$  rango (valores mínimo y máximo). \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ .

A continuación, se estudió la relación entre el incremento de SICs inducido por 5-HT y la activación de receptores de tipo 5-HT<sub>2</sub> en astrocitos. La presencia en la solución extracelular del antagonista ciproheptadina (antagonista no selectivo para la familia de receptores 5-HT<sub>2</sub>, 10 nM), previno el aumento en la frecuencia de las corrientes SICs tras la estimulación con 5-HT ( $0,72 \pm 0,19 \text{ min}^{-1}$  control frente a  $0,10 \pm 0,04 \text{ min}^{-1}$  control + cipro.,  $n=7$ ,  $n=6$  células respectivamente,  $N=5$  ratones; ANOVA de una vía, post hoc test de Dunn,  $P=0,010$ )(Figura R14), indicando que la estimulación de receptores 5-HT<sub>2</sub> estaba vinculada a la liberación de gliotransmisor por parte de los astrocitos. Para confirmar la dependencia de estas corrientes de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos, se registraron SICs en ratones *Ip3r2*<sup>-/-</sup>. Los resultados obtenidos confirmaron una disminución significativa de la frecuencia de SICs evocadas por 5-HT ( $0,72 \pm 0,19 \text{ min}^{-1}$  control frente a  $0,10 \pm 0,07 \text{ min}^{-1}$  *Ip3r2*<sup>-/-</sup>,  $n=7$ ,  $n=6$  células,  $N=5$ ,  $N=2$  ratones respectivamente; ANOVA de una vía, post hoc test de Dunn,  $P=0,012$ ), apoyando la relación causal entre el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  en el astrocito tras la estimulación con 5-HT y la aparición de estas SICs en las neuronas de capa 2/3 de CPFm de ratones control.

Con el fin de asegurar que las corrientes registradas estaban mediadas por la activación de receptores NMDA neuronales, el antagonista selectivo D-AP5 (50  $\mu\text{M}$ ) fue perfundido en la solución extracelular dando lugar al bloqueo de estas corrientes (Figura R14b).



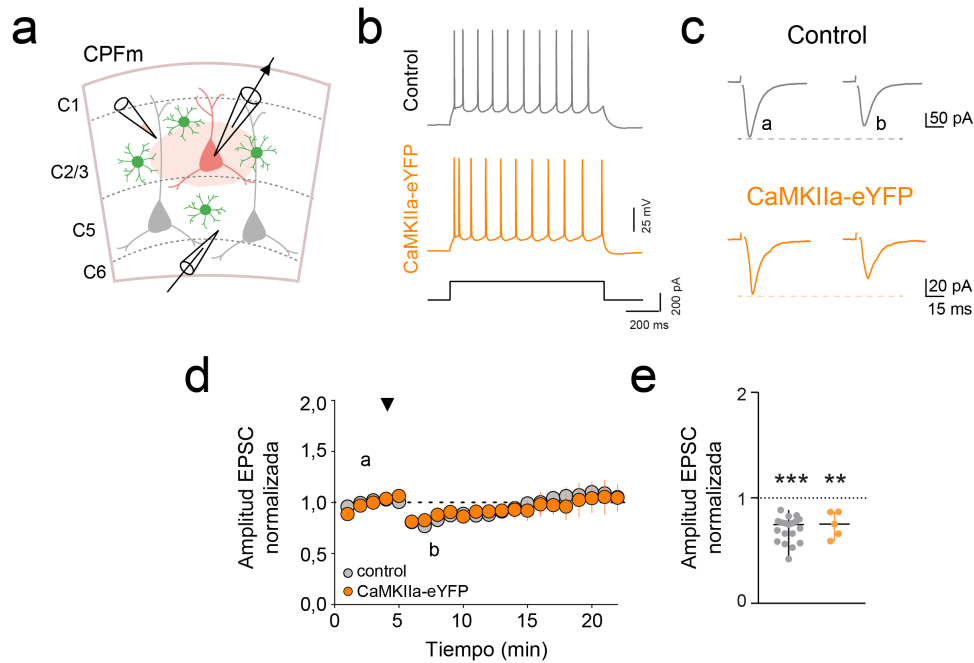
**Figura R14. La gliotransmisión evocada por 5-HT requiere la activación de receptores 5-HT<sub>2</sub> y NMDA. a)** Trazos representativos de SICs antes y después de la aplicación local de 5-HT y en presencia de ciproheptadina en ratones control. El asterisco rojo indica la presencia de SICs. **b)** Gráfico de dispersión de SICs registradas antes (5 min) y después de 5-HT (5 min), mostrando un aumento significativo de la frecuencia después de la estimulación con 5-HT en ratones control con respecto a la situación basal ( $n = 7$  células,  $N = 5$  ratones; ANOVA de una vía, test de Tukey  $P=0,041$ ). Este aumento en la frecuencia de SICs no se observa en presencia de ciproheptadina ( $0,72 \pm 0,19 \text{ min}^{-1}$  en control frente a  $0,10 \pm 0,04 \text{ min}^{-1}$  control + cipro,  $n=6$  células,  $N=3$  ratones, ANOVA de una vía, test de Dunn,  $P=0,010$ ), AP5 ( $0,72 \pm 0,19 \text{ min}^{-1}$  en control frente a  $0,04 \pm 0,03 \text{ min}^{-1}$  control + AP5,  $n=10$  células,  $N=4$  ratones, ANOVA de una vía, test de Dunn,  $P=0,001$ ), y tampoco en ratones *Ip3r2*<sup>-/-</sup> ( $0,72 \pm 0,19 \text{ min}^{-1}$  en control frente a  $0,10 \pm 0,07 \text{ min}^{-1}$  *Ip3r2*<sup>-/-</sup>,  $n=6$  células,  $N=2$  ratones, ANOVA de una vía, test de Dunn,  $P=0,012$ ). Los datos se muestran como mediana  $\pm$  rango (valores mínimo y máximo). \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ .

En conjunto, estos resultados sugieren que la gliotransmisión tanto espontánea como evocada por 5-HT está comprometida en el TD, y que en la generación de SICs asociadas a 5-HT intervienen los receptores 5-HT<sub>2</sub> presentes en astrocitos y los receptores NMDA neuronales.

## 8. 5-HT induce plasticidad sináptica en CPFm

### 8.1. 5-HT deprime de forma transitoria la transmisión sináptica excitadora en neuronas de la capa 2/3 de CPFm

La transmisión y plasticidad sináptica están estrechamente reguladas por la señalización serotoninérgica (Lesch y Waider 2012), que está implicada en importantes procesos fisiológicos, como el sueño, la temperatura corporal, el apetito, el dolor, la actividad motora o las relaciones sociales (Young y Leyton 2002; Olivier 2015). Estudios previos en rodajas cerebrales de CPF han demostrado que 5-HT induce una inhibición de la transmisión sináptica excitadora (Zhong et al., 2008a; Tian et al., 2017). En línea con estos resultados, los registros electrofisiológicos realizados en neuronas piramidales previamente marcadas con eYFP (ver apartado 3.1 de Materiales y métodos) y los registros a ciegas en neuronas potencialmente piramidales de capa 2/3 (Figura R15), confirmaron este efecto inhibitorio sobre las respuestas postsinápticas excitadoras (EPSCs) en animales control. De este modo, la aplicación local de 5-HT mediante un pulso de presión (1 mM; 10 s, 1 bar) con una micropipeta localizada en la capa 2/3 de CPFm, indujo una depresión transitoria de las EPSCs ( $0,77 \pm 0,03$ ,  $n=11$  células,  $N=8$  ratones; prueba t de Student pareada,  $P < 0,001$ ) (Figura R16).

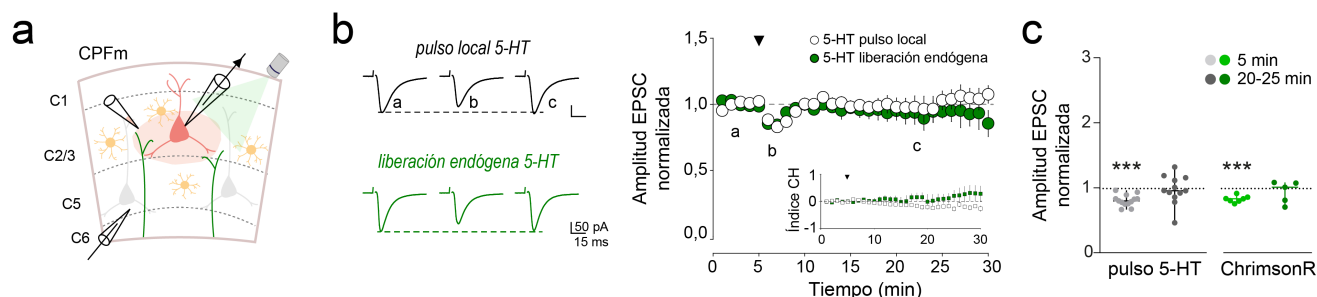


**Figura R15. Depresión sináptica transitoria de las EPSCs inducida por 5-HT en neuronas piramidales de capa 2/3 de CPFm.** **a)** Esquema del abordaje experimental para el registro electrofisiológico de neuronas de C2/3 de CPFm. Se observa el estimulador posicionado en C5 y las pipetas de registro y del pulso de presión de 5-HT en C2/3. **b)** Patrón de disparo representativo de neuronas potencialmente piramidales (control, gris) y neuronas piramidales (CaMKIIa-eYFP). Se ha utilizado la expresión del virus AAV5-CaMKIIa-eYFP para visualizar y registrar células piramidales. **c)** Trazos representativos de EPSC registradas antes (a) y después (b) de la estimulación con 5-HT (promedio de 20 respuestas consecutivas). **d)** Amplitud normalizada de EPSCs a lo largo del tiempo antes y después del estímulo de 5-HT (triángulo negro) en células potencialmente piramidales (control, n = 19 células, N = 8 ratones) y células piramidales que expresan CaMKIIa-eYFP (n = 5 células, N = 2 ratones). Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM. **e)** Gráfico de dispersión mostrando los cambios en la amplitud de EPSC normalizada durante los primeros 5 min después de la aplicación del pulso de presión de 5-HT. Nótese que 5-HT induce una depresión sináptica transitoria de las EPSCs similar en ambas condiciones ( $0,70 \pm 0,03$  control;  $0,75 \pm 0,06$  CaMKIIa-eYFP). Prueba t de Student pareada,  $**P < 0,01$ .  $***P < 0,001$ . Los datos se muestran como mediana  $\pm$  rango (valores mínimo y máximo).

Para confirmar que este efecto no era resultado de la presencia de 5-HT en el medio de forma artificial, se estudió la respuesta a la liberación endógena de 5-HT por parte de las fibras serotoninérgicas presentes en CPFm procedentes del NDR. Para ello, utilizando la misma estrategia viral ya descrita (ver apartado 3), se realizaron inyecciones del virus AAV9-hSyn-ChrimsonR-tdTom en el NDR de ratones control. Tres semanas después, se realizaron registros electrofisiológicos *ex vivo* en neuronas piramidales en las capas 2/3 de CPFm. Para activar las proyecciones axonales del NDR a CPFm que expresaban ChrimsonR, las rodajas se estimularon con pulsos de luz (50 ms a 5 Hz, 550 nm), y de esta manera se conseguía la activación de las fibras en su mayoría serotoninérgicas, como indicaba su colocalización con el transportador para 5-HT, SERT ( $81,26 \pm 1,72\%$ , Figura R4c). La activación optogenética indujo una depresión transitoria de las EPSCs en las neuronas de CPFm ( $0,83 \pm 0,02$ , n=7 células, N=4 ratones; prueba t de Student pareada,  $P < 0,001$ ) (Figura R16). Estos resultados ratificaron los datos obtenidos con los pulsos de presión de 5-HT, y, por tanto, validaron el uso de esta aproximación

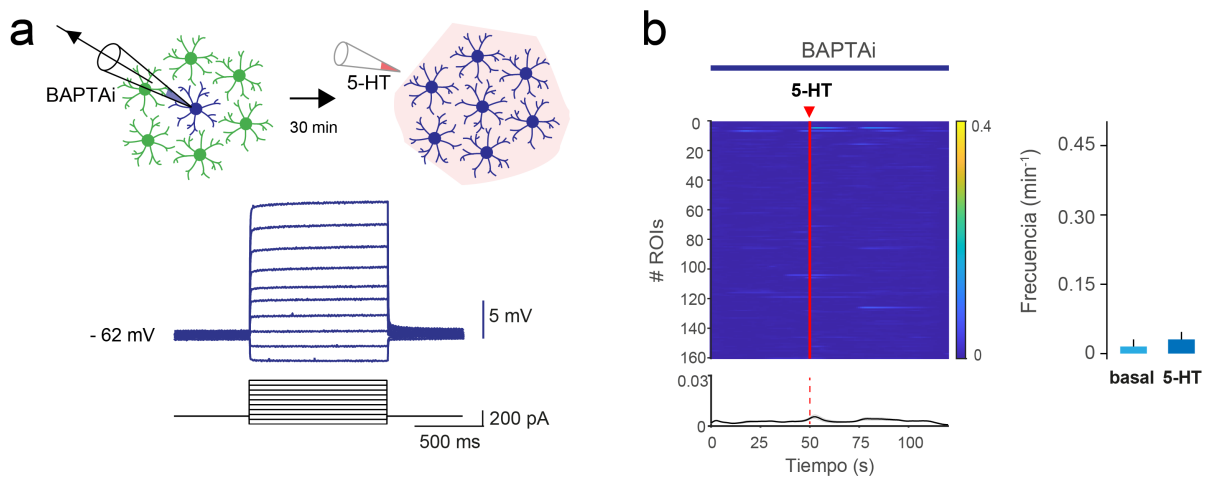


experimental para estudiar los fenómenos de plasticidad sináptica inducidos por 5-HT presentados en esta tesis doctoral.

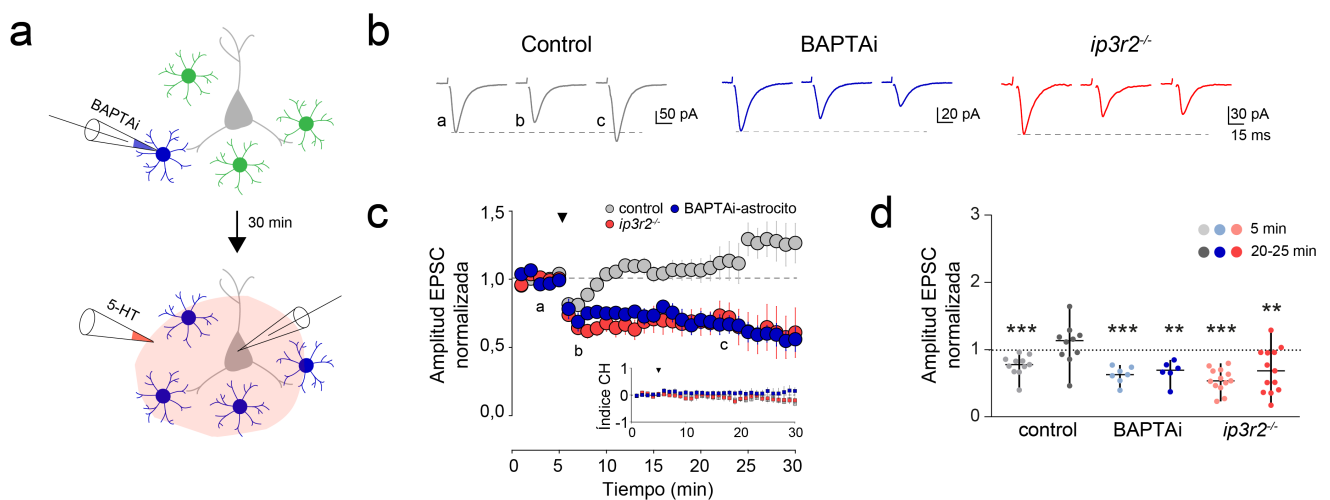


## 8.2. Los astrocitos participan en la plasticidad sináptica inducida por 5-HT

Considerando que los astrocitos son capaces de modular la transmisión y plasticidad sinápticas regulando características estructurales y fisiológicas de las sinapsis (Allen y Eroglu 2017), se evaluó el papel de estas células en la plasticidad sináptica inducida por 5-HT. En primer lugar, se inhibió la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos mediante el uso del quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  BAPTA (40 mM) a través de la pipeta de registro (Mederos et al., 2021) en la capa 2/3 de la CPFm (Figura R17a). Al cabo de 30 min, permitiendo el llenado de la red astrocitaria con BAPTA (Mederos et al., 2019), se constató la ausencia de señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  tanto espontánea como inducida por 5-HT (Figura R17b).



En estas condiciones experimentales se registraron las neuronas de capa 2/3 y la actividad sináptica excitadora (en un radio máximo de  $107,96 \mu\text{m}$  del astrocito registrado) (Figura R18a). Se observó que la estimulación local con 5-HT, a diferencia de los registros en condiciones control, inducía una depresión sostenida de las EPSCs ( $0,67 \pm 0,07$ ,  $n=6$  células,  $N=5$  ratones; prueba t de Student pareada,  $P=0,004$ ) (Figura R18b-d).



**Figura R18. La señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos de CPFm contribuye a la plasticidad sináptica evocada por 5-HT.** **a)** Esquema del llenado de astrocitos de capa 2/3 de CPFm con BAPTA intracelular (BAPTAi) para el

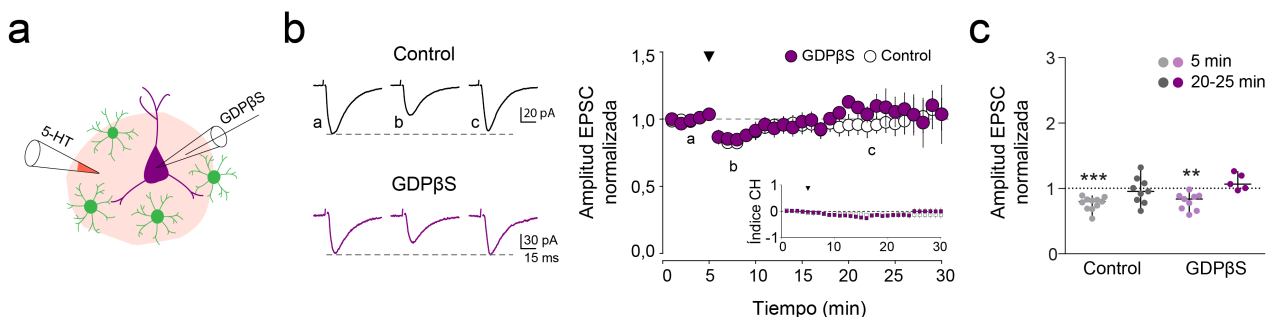


bloqueo del  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitario, y la posterior aplicación local de 5-HT durante el registro de una neurona localizada en la misma área. **b)** Trazos representativos de EPSC registradas antes (a), 5 min (b) y 20-25 min (c) después de la estimulación con 5-HT (promedio de 20 respuestas consecutivas) en ratones control (gris), tras el llenado de astrocitos con BAPTAi (azul), y en ratones *Ip3r2*<sup>-/-</sup> (rojo). **c)** Amplitud normalizada de EPSCs e índice para el valor de corriente de la membrana (corriente de *holding*, CH) a lo largo del tiempo antes y después de la aplicación de un pulso de 5-HT (triángulo negro) en ratones control (n=11 células, N=7 ratones), tras el bloqueo con BAPTAi (n=7 células, N=5 ratones) y en ratones *Ip3r2*<sup>-/-</sup> (n=13 células, N=10 ratones). Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM. **(d)** Gráfico de dispersión mostrando los cambios en la amplitud de EPSC registradas durante los primeros 5 min (efectos sinápticos a corto plazo) y después de 20-25 min de la estimulación con 5-HT (efectos sinápticos a largo plazo). Obsérvese que la reducción de la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos indujo una depresión sináptica persistente, prueba t de Student pareada,  $P=0,004$  para control + astrocito-BAPTAi,  $P=0,006$  para ratones *Ip3r2*<sup>-/-</sup>. \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ . Los datos se muestran como mediana  $\pm$  rango (valores mínimo y máximo).

Para confirmar estos resultados, se estudió el efecto de 5-HT sobre la transmisión sináptica excitadora en ratones *Ip3r2*<sup>-/-</sup>, que muestran una señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  disminuida en los astrocitos (ver Figura R8, apartado 3) (Navarrete et al., 2012; Srinivasan et al., 2015; Agarwal et al., 2017; Sherwood et al., 2021). La estimulación con 5-HT provocó una depresión sostenida de las EPSC en las neuronas de ratones *Ip3r2*<sup>-/-</sup> ( $0,69 \pm 0,09$ , n= 13, N= 10 ratones; prueba t de Student pareada,  $P = 0,006$ ), similar a las respuestas observadas tras bloquear la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos con BAPTA intracelular (Figura R18b-d), confirmando la importancia de estas señales y la participación de los astrocitos en la plasticidad sináptica mediada por 5-HT.

En conjunto, estos resultados apoyan el papel crítico de la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitario en la plasticidad sináptica mediada por 5-HT en los circuitos corticales.

Las neuronas presentan distintos receptores para 5-HT en su membrana que pueden ser activados por la estimulación serotoninérgica que se aplica en este estudio (Aghajanian y Marek, 1997; Celada et al., 2013; Kjaerby et al., 2016). Por tanto, es muy probable que además de los receptores serotoninérgicos astrocitarios, los receptores neuronales participen en las respuestas observadas. Para dilucidar su contribución, se incluyó en la solución intracelular de la pipeta de registro guanosina 5'-[ $\beta$ -tio]difosfato (GDP $\beta$ S, 2 mM), un inhibidor de la actividad derivada de proteínas G. En estas condiciones, en la que estaban inhibidos todos los receptores postsinápticos asociados a proteínas G, incluyendo los receptores metabotrópicos para 5-HT, la estimulación serotoninérgica indujo una depresión transitoria de las EPSCs similar a la obtenida en los registros control ( $0,80 \pm 0,04$  en presencia de GDP $\beta$ S, n=9 células, N=5 ratones frente a  $0,77 \pm 0,03$  en control, n=11 células, n=7 ratones; ANOVA de una vía,  $P = 0,572$ ) (Figura R19).



**Figura R19. Los receptores metabotrópicos postsinápticos no participan en la plasticidad sináptica inducida por 5-HT.** **a)** Esquema mostrando el llenado intracelular de la neurona postsináptica de capa 2/3 de CPFm con GDP $\beta$ S y la posterior aplicación local de 5-HT, en el mismo campo de registro. **b)** Izda, trazos representativos de EPSC registradas antes (a), 5 min (b) y 20-25 min (c) después de la estimulación con 5-HT (promedio de 20 respuestas consecutivas) en ratones control (negro), y tras es el bloqueo con GDP $\beta$ S (morado). Dcha, amplitud normalizada de EPSCs e índice para el valor de corriente de la membrana (corriente de *holding*, CH) a lo largo del tiempo antes y después de la aplicación de un pulso de 5-HT (triángulo negro) en ratones control (n=11 células, N=7 ratones), y tras el bloqueo con GDP $\beta$ S (n=9 células, N=5 ratones). Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM. **c)** Gráfico de dispersión mostrando los cambios en la amplitud de EPSC registradas durante los primeros 5 min (efectos sinápticos a corto plazo) y después de 20-25 min de la estimulación con 5-HT (efectos sinápticos a largo plazo). Prueba t de Student pareada,  $P \leq 0,001$ . Nótese que la presencia intracelular de GDP $\beta$ S en las neuronas piramidales no afecta la modulación sináptica inducida por 5-HT (ANOVA de una vía,  $P > 0,05$ ). \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ . Los datos se muestran como mediana  $\pm$  rango (valores mínimo y máximo).

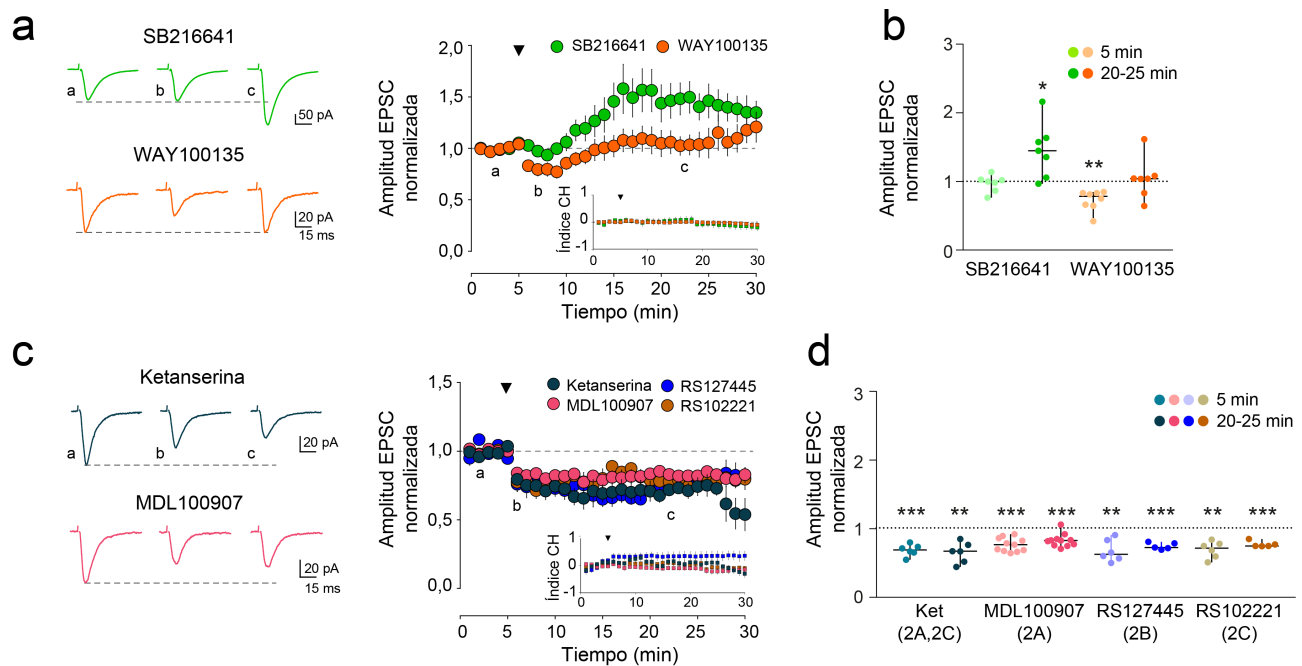
Estos resultados indican que los receptores metabotrópicos para 5-HT presentes en las neuronas postsinápticas no contribuyen de manera significativa a la plasticidad sináptica inducida por 5-HT, y apoyan el papel crítico de los astrocitos en esta modulación.

### 8.3. Caracterización de los receptores serotoninérgicos involucrados en la modulación sináptica inducida por 5-HT

De entre los distintos receptores para 5-HT, se ha descrito que la expresión de los 5-HT<sub>1A,1B</sub> en los terminales presinápticos, serotoninérgicos y no serotoninérgicos, de capa 2/3 de CPFm (Goodfellow et al., 2009; Proulx et al., 2010; Kjaerby et al., 2016) produce un efecto inhibitorio sobre la transmisión sináptica excitadora (Richardson-Jones et al., 2011; Kjaerby et al., 2016). A continuación, se investigó el rol de los receptores 5-HT<sub>1A,1B</sub> en la plasticidad sináptica evocada por 5-HT. Para ello, se registraron neuronas piramidales de capa 2/3 de CPFm en presencia de antagonistas selectivos para los receptores 5-HT<sub>1A</sub> (WAY100135) y 5-HT<sub>1B</sub> (SB216641). Se observó que la presencia de SB216641 (50  $\mu$ M) bloqueó la depresión de las EPSCs inducidas por 5-HT ( $0,97 \pm 0,05$ , n=7 células, N=4 ratones; prueba t de Student pareada,  $P = 0,557$ ) (Figura R20a, b). Además, en presencia de este antagonista se observó una potenciación sináptica a largo plazo ( $1,46 \pm 0,15$ ; prueba t de Student pareada,  $P = 0,023$ ) (Figura R20a, b). Por el contrario, el bloqueo del receptor 5-HT<sub>1A</sub> con WAY100135 (10  $\mu$ M) no afectó a la depresión sináptica transitoria inducida por 5-HT ( $0,73 \pm 0,05$ , n=8 células, N=4 ratones; Prueba t de Student pareada,  $P = 0,001$ ) (Figura R20a, b), lo que sugiere un papel predominante de los receptores 5-HT<sub>1B</sub> en la inhibición sináptica inducida por 5-HT en la capa 2/3 de la CPFm (Kjaerby et al., 2016).

En línea con los resultados previos que muestran la activación de los receptores 5-HT<sub>2A,2B,2C</sub> en astrocitos, se investigó si los receptores 5-HT<sub>2</sub> estaban implicados en la plasticidad sináptica descrita. El bloqueo del receptor 5-HT<sub>2A</sub> con ketanserina (10  $\mu$ M) o MDL100907 (1  $\mu$ M) indujo una depresión de las EPSC de larga duración (Figura R20c, d). De forma similar, la presencia de antagonistas selectivos de los receptores 5-HT<sub>2B</sub> (RS127445, 1  $\mu$ M) y 5-HT<sub>2C</sub> (RS102221, 1  $\mu$ M) en la solución extracelular produjo una depresión sostenida de las EPSCs tras el estímulo con 5-HT (Figura R20c, d). Cabe destacar, que la presencia de estos antagonistas indujo una

respuesta sináptica equivalente a la obtenida tras el bloqueo de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en astrocitos (véase Figura R18, apartado 8.2.), lo que podría sugerir un mecanismo de acción común.



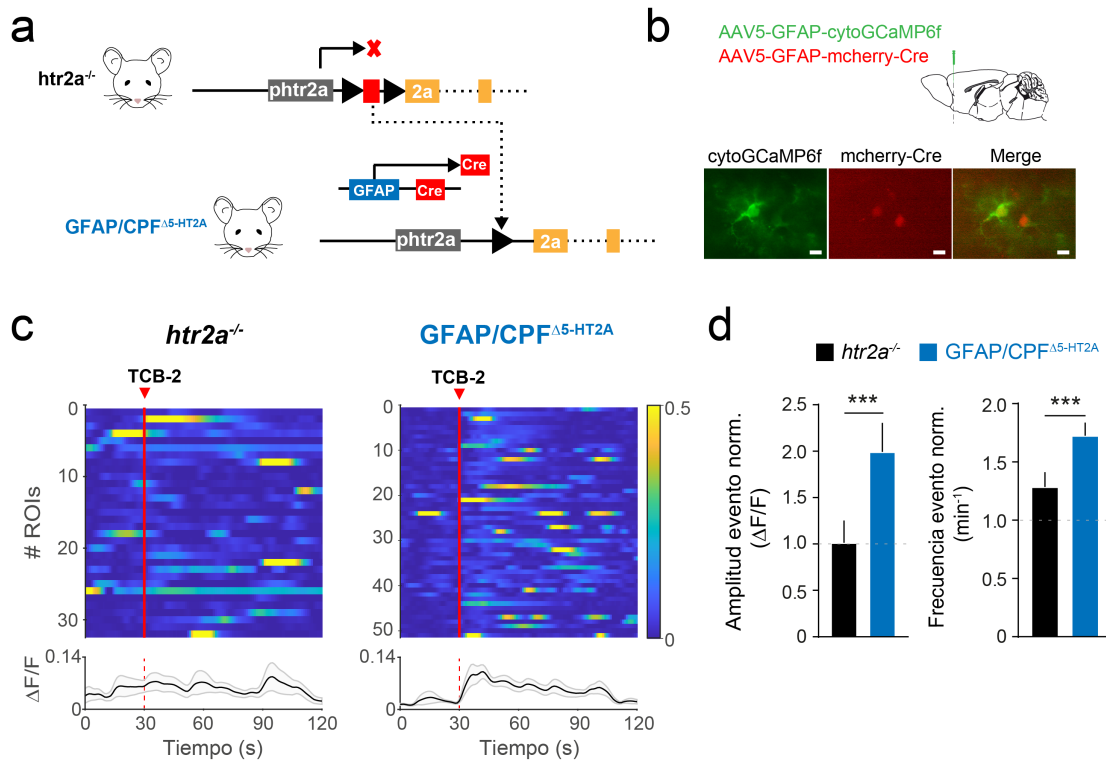
**Figura R20. La plasticidad sináptica inducida por 5-HT requiere la activación de receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2</sub>.** **a)** Izda, trazos representativos de EPSC registradas antes (a), 5 min (b) y 20-25 min (c) después de la estimulación con 5-HT (promedio de 20 respuestas consecutivas) en presencia de SB216641 (verde) y WAY100135 (naranja). Dcha, amplitud normalizada de EPSCs e índice para el valor de corriente de la membrana (corriente de *holding*, CH) a lo largo del tiempo antes y después de la aplicación de un pulso de 5-HT (triángulo negro) en presencia de SB216641 (n=7 células, N=4 ratones) y WAY100135 (n=8 células, N=4 ratones). Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM. **b)** Gráfico de dispersión mostrando los cambios en la amplitud de EPSC registradas durante los primeros 5 min (efectos sinápticos a corto plazo) y después de 20-25 min de la estimulación con 5-HT (efectos sinápticos a largo plazo). Nótese que el bloqueo del receptor 5-HT<sub>1B</sub> induce una potenciación sináptica persistente de la transmisión sináptica excitatoria (Prueba t de Student pareada,  $P = 0,023$ ). **c)** Izda, trazos representativos de EPSC registradas antes (a), 5 min (b) y 20-25 min (c) después de la estimulación con 5-HT (promedio de 20 respuestas consecutivas) en presencia de ketanserina (azul), MDL100907 (rosa), RS127445 (azul) y RS102221 (marrón). Dcha, amplitud normalizada de EPSCs e índice de CH a lo largo del tiempo antes y después de la aplicación de 5-HT en presencia de ketanserina (n=6 células, N=3 ratones), MDL100907 (n=11 células, N=4 ratones), RS127445 (n=6 células, N=2 ratones) y RS102221 (n=6 células, N=2 ratones) en ratones de control. **d)** Gráfico de dispersión mostrando los cambios en la amplitud de EPSC registradas durante los primeros 5 min y después de 20-25 min de la estimulación con 5-HT. Obsérvese que los antagonistas de la familia de receptores 5-HT<sub>2</sub> inducen una depresión sináptica persistente de la transmisión sináptica excitatoria (Prueba t de Student pareada,  $P = 0,002$  para ketanserina,  $P < 0,001$  para MDL100907, RS127445 y RS102221). \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ . Los datos se muestran como mediana  $\pm$  rango (valores mínimo y máximo).

En conjunto, estos resultados sugieren una acción cooperativa de los receptores presinápticos 5-HT<sub>1B</sub> y los receptores 5-HT<sub>2</sub> presentes en los astrocitos en el efecto neto de 5-HT en la plasticidad sináptica de los circuitos excitatorios en CPFm.

#### 8.4. Contribución del receptor 5-HT<sub>2A</sub> expresado en astrocitos en la plasticidad sináptica inducida por 5-HT

Entre los distintos subtipos de receptores 5-HT<sub>2</sub> es preciso enfatizar el papel de los 5-HT<sub>2A</sub>, cuya expresión se ha visto aumentada en tejido post mortem de pacientes con TD (Pandey et al., 2002; Underwood et al., 2018) y están considerados como una posible diana para el tratamiento con antidepresivos (Shelton et al., 2001; Zaniowska et al., 2010). Sin embargo, a pesar de que la expresión del mismo se ha visto exacerbada en astrocitos de la CPFm en pacientes con enfermedades psiquiátricas (Wu et al., 1999), la relevancia del receptor 5-HT<sub>2A</sub> en astrocitos ha sido poco explorada.

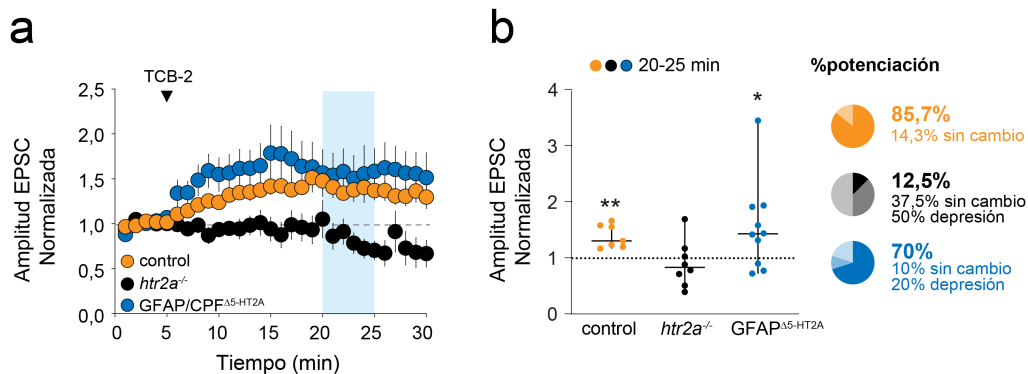
Con el fin de profundizar en el papel que juegan estos receptores monoaminérgicos en astrocitos de CPFm, se utilizó el ratón transgénico *htr2a*<sup>-/-</sup> (Weisstaub et al., 2006) que presenta el gen *htr2a* flanqueado por secuencias lox-p, lo que bloquea la transcripción y traducción del mismo, permitiendo la recuperación de su expresión en tipos celulares específicos mediante la utilización de promotores ligados a Cre-recombinasa. Así, mediante la transfección con un virus que contenía GFAP-Cre (AAV5-GFAP-mcherry-cre) se validó el restablecimiento funcional de la expresión de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> exclusivamente en astrocitos de CPFm (Figura R21a, b). Para ello, se registró la existencia de actividad de Ca<sup>2+</sup> evocada por un agonista específico del receptor 5-HT<sub>2A</sub>, TCB-2 (10 μM), en los astrocitos de los ratones en los que se ha rescatado la expresión del receptor 5-HT<sub>2A</sub> (GFAP/CPF<sup>Δ5-HT2A</sup>). Como resultado, se observó un aumento de la actividad de Ca<sup>2+</sup> evocada por TCB-2 en astrocitos en los que existía una colocalización entre el sensor de Ca<sup>2+</sup> (GCaMP6f) y el reportero (mcherry- Cre) con respecto a los astrocitos de ratones *htr2a*<sup>-/-</sup> (amplitud normalizada: 1,99 ± 0,31 GFAP/CPF<sup>Δ5-HT2A</sup> frente a 1,01 ± 0,24 *htr2a*<sup>-/-</sup>; n=51 y n=32 ROIs, N=2 y N=2 ratones respectivamente, prueba t de Student, P< 0,001) (Figura R21b-d).



**Figura R21. Rescate específico del receptor 5-HT<sub>2A</sub> en astrocitos de CPFm en ratones *htr2a*<sup>-/-</sup>.** **a)** Esquema del bloqueo de la expresión del gen *htr2a* (ratón *htr2a*<sup>-/-</sup>) y de la estrategia viral utilizada para el restablecimiento de la expresión del receptor 5-HT<sub>2A</sub> específicamente en astrocitos, ratón GFAP/CPF<sup>Δ5-HT2A</sup>. El rectángulo gris marcado con *phtr2a* representa el promotor endógeno para el gen del receptor 5-HT<sub>2A</sub>. El rectángulo rojo flanqueado por secuencias lox-p (flechas negras) insertado antes del primer codón de iniciación del gen *htr2a* representa el bloqueo de la transcripción y traducción del mismo. Los rectángulos amarillos representan los exones del gen *htr2a*. Los rectángulos rojos y azul muestran la expresión de Cre bajo el promotor de GFAP respectivamente, que interactúan con las secuencias lox-p para eliminar el bloqueo y restaurar la expresión del gen *htr2a*. **b)** Arriba, esquema de la estrategia viral utilizada mostrando la coinfección de los virus que contienen cytoGCaMP6f y mcherry-Cre bajo el promotor GFAP en CPFm en ratones *htr2a*<sup>-/-</sup> para la expresión del receptor 5-HT<sub>2A</sub> en astrocitos. Abajo, imágenes representativas de epifluorescencia de astrocitos de CPFm que expresan cytoGCaMP6f (verde) y mcherry-cre (rojo). **c)** Gráfico representativo de la actividad basal y evocada por TCB-2 de los ROIs y de la actividad promedio de astrocitos en ratones *htr2a*<sup>-/-</sup> (izda) y GFAP/CPF<sup>Δ5-HT2A</sup> (dcha). El código de intensidad de color denota cambios de fluorescencia. Los datos se representan como la media ± SEM. **d)** Gráfico de barras representando cambios en la amplitud y frecuencia de eventos de Ca<sup>2+</sup> inducidos por TCB-2 en ratones *htr2a*<sup>-/-</sup> (negro) y GFAP/CPF<sup>Δ5-HT2A</sup> (azul). Los valores se normalizaron con respecto a la actividad espontánea antes de la estimulación. \*\*\*P < 0,001.

Los receptores 5-HT<sub>2A</sub> en CPFm están involucrados en la regulación de la transmisión sináptica, potenciando la excitación y participando en la modulación de los estados emocionales (Celada et al., 2013; Nakao et al., 2022). Así, se quiso estudiar la contribución específica de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> presentes en astrocitos a la plasticidad sináptica mediada por estos receptores. Para ello, se compararon las respuestas sinápticas de las neuronas de capa 2/3 de CPFm de los ratones GFAP/CPF<sup>Δ5-HT2A</sup>, en el que se ha validado la recuperación funcional y selectiva del receptor 5-HT<sub>2A</sub> en astrocitos, con las obtenidas de los ratones *htr2a*<sup>-/-</sup> y silvestres (control) (Figura R22). Se observó que la activación de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> con TCB-2 en

ratones *htr2a*<sup>-/-</sup> no producía efecto alguno de potenciación sináptica (20-25 min tras la aplicación de TCB-2;  $0,90 \pm 0,15$ ,  $n = 8$  células,  $N = 4$  ratones; prueba t de Student pareada,  $P = 0,517$ ), al contrario que los ratones control ( $1,39 \pm 0,08$ ,  $n = 7$  células,  $N = 4$  ratones, prueba t de Student,  $P=0,002$ ) (Figura R22). Sorprendentemente, los ratones GFAP/CPF $\Delta 5$ -HT $2A$  mostraron una potenciación persistente en el 70% de las neuronas registradas ( $1,55 \pm 0,25$ ,  $n = 10$  células,  $N = 4$  ratones; prueba t de Student pareada,  $P = 0,027$ ), similar a la obtenida en los ratones control (prueba t de Student,  $P = 0,696$ ) (Figura R22).

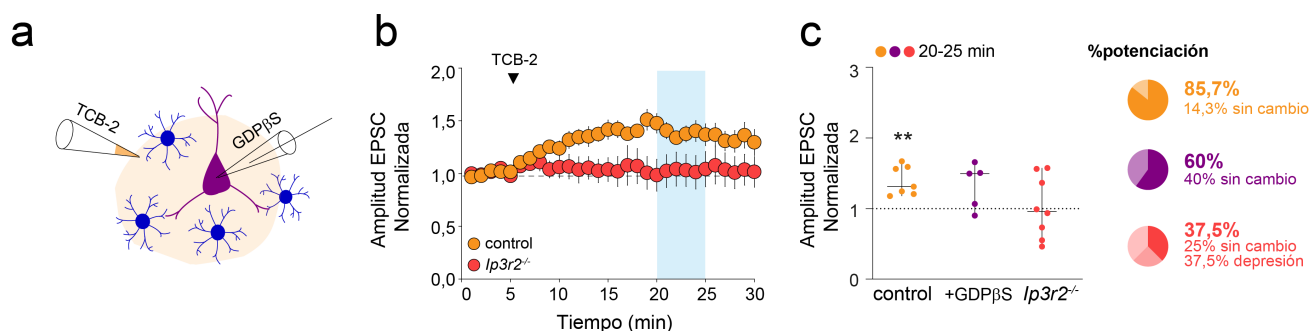


**Figura R22. La activación de receptores 5-HT $2A$  en astrocitos induce una potenciación de las EPSCs.** **a)** Amplitud normalizada de EPSCs a lo largo del tiempo antes y después de la aplicación de un pulso de TCB-2 en ratones control (naranja), *htr2a*<sup>-/-</sup> (negro) y GFAP/CPF $\Delta 5$ -HT $2A$  (azul). La caja azul representa el tiempo considerado para las respuestas a largo plazo (20-25 min). **b)** Izda, gráfico de dispersión mostrando los cambios en la amplitud de EPSC registradas después de 20-25 min de la estimulación con TCB-2 (efectos sinápticos a largo plazo). Dcha, gráficos circulares mostrando el % de potenciación (naranja oscuro, negro, azul oscuro), ausencia de cambio o depresión de las EPSCs para cada condición. \* $<0,05$ , \*\* $P < 0,01$ . Los datos se muestran como mediana  $\pm$  rango (valores mínimo y máximo).

Cabe mencionar que las respuestas obtenidas en los ratones GFAP/PFC $\Delta 5$ -HT $2A$  muestran una marcada variabilidad, ya que un 30% de las células no presentaron potenciación sináptica a largo plazo (Figura R22b). Este resultado está en línea con los datos obtenidos en los ratones *Ip3r2*<sup>-/-</sup> en los que se observó que la potenciación sináptica inducida por TCB-2 está parcialmente inhibida ( $1,02 \pm 0,15$ ,  $n = 8$  células,  $N = 4$  ratones; prueba t de Student pareada,  $P = 0,891$ ) (Figura R23b, c). Por tanto, estos resultados sugieren una contribución significativa de los receptores 5-HT $2A$  astrocitarios en la plasticidad sináptica obtenida. Asimismo, los porcentajes observados apuntan a una participación de los receptores 5-HT $2A$  neuronales en esta potenciación sináptica. Para confirmar la contribución neuronal vía 5-HT $2A$  postsinápticos, se incluyó en la solución intracelular de la pipeta de registro de las neuronas GDP $\beta$ S, con el fin de bloquear, entre otros, la señal intracelular inducida por la activación de receptores 5-HT $2A$  neuronales (Figura R23a). En estas condiciones, la estimulación con TCB-2 indujo potenciación a largo plazo (20-25 min) en el 60% de las neuronas registradas (3 de 5) (Figura R23c). Sin embargo, a nivel poblacional el efecto no resultó significativo ( $1,33 \pm 0,14$ ;  $n=5$  células,  $N=2$  ratones, prueba t de Student pareada,  $P= 0,088$ ). Por tanto, en línea con los resultados obtenidos con el rescate selectivo del receptor en astrocitos en los ratones GFAP/PFC $\Delta 5$ -HT $2A$ , estos datos indican que los receptores 5-HT $2A$  neuronales contribuyen a la plasticidad



sináptica inducida por TCB-2. Así, la plasticidad sináptica mediada por los receptores 5HT<sub>2A</sub> en CPFm resulta de la activación conjunta de neuronas y astrocitos.



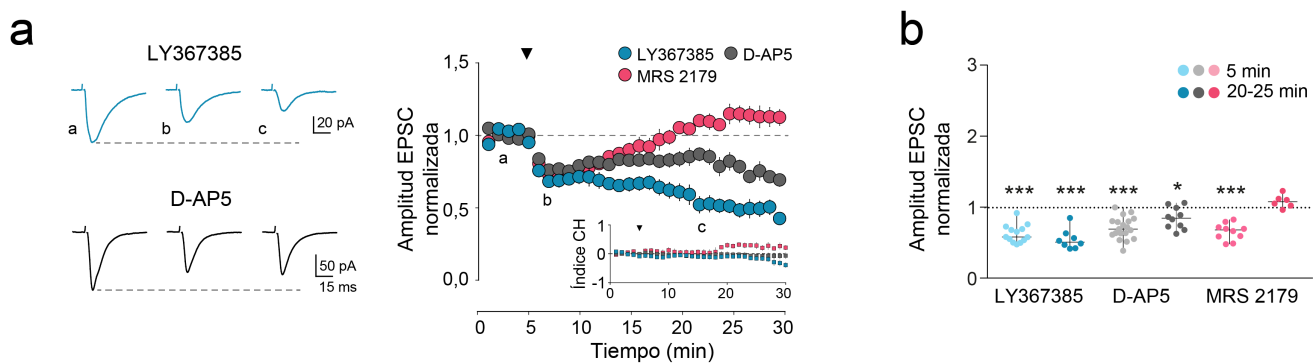
**Figura R23. La potenciación de las EPSCs en CPFm por TCB-2 depende de la activación conjunta de astrocitos y neuronas.** **a)** Esquema mostrando el llenado intracelular de la neurona postsináptica de capa 2/3 de CPFm con GDPβS y la aplicación local de TCB-2 en el mismo campo de registro. **b)** Amplitud normalizada de EPSCs a lo largo del tiempo antes y después de la aplicación de un pulso de TCB-2 en ratones de control (naranja), *Ip3r2<sup>-/-</sup>* (rojo). La caja azul representa el tiempo considerado para las respuestas a largo plazo (20-25 min). **c)** Izda, gráfico de dispersión mostrando los cambios en la amplitud de EPSC registradas después de 20-25 min de la estimulación con TCB-2 (efectos sinápticos a largo plazo) en ratones control, en presencia de GDPβS (violeta) y en ratones *Ip3r2<sup>-/-</sup>*. Dcha, gráficos circulares mostrando el % de cambio en las respuestas sinápticas a nivel poblacional (naranja oscuro, violeta y rojo oscuro denotan potenciación), para cada condición. \*\*P < 0,01. Los datos se muestran como mediana ± rango (valores mínimo y máximo).

## 8.5. Estudio de los gliotransmisores involucrados en la plasticidad sináptica evocada por 5-HT

Los astrocitos pueden modular la plasticidad sináptica y el comportamiento mediante la liberación de diferentes gliotransmisores, como glutamato, D-serina y ATP (Oliveira et al., 2015), entre otros. Estos gliotransmisores pueden impactar sobre la plasticidad sináptica mediante la activación de receptores neuronales pre- y postsinápticos. De esta manera, la liberación de glutamato puede activar receptores metabotrópicos para glutamato I (mGluR1) localizados en los terminales presinápticos promoviendo potenciación sináptica (Perea y Araque 2007; Navarrete y Araque 2010; Gómez-Gonzalo et al., 2015), y receptores NMDA pre- (Jourdain et al., 2007; Min y Nevian 2012) y postsinápticos (Araque et al., 1998; Angulo et al., 2004; Fellin et al., 2004; Shigetomi et al., 2008), favoreciendo fenómenos de plasticidad sináptica. La liberación de D-serina contribuye a la señalización y plasticidad mediada por los receptores NMDA (Patanier et al., 2006; Henneberger et al., 2010; Min y Nevian 2012), críticos en los mecanismos de plasticidad sináptica. Asimismo, la liberación de ATP/Ado pueden activar distintos receptores purinérgicos, que pueden actuar tanto en los procesos astrocitarios, actuando como mensajeros intercelulares de la red astrocitaria (Anderson et al., 2004; Koizumi et al., 2005), como en membranas neuronales pre- y postsinápticas, regulando de este modo la transmisión sináptica (Patanier et al., 2011; Di Castro et al., 2011).



En este contexto, se quiso estudiar el papel de algunos de estos gliotransmisores en la plasticidad sináptica inducida por 5-HT. En presencia de LY367385 (100  $\mu$ M), un antagonista selectivo de los receptores metabotrópicos para glutamato tipo 1a (mGluR1a), o de D-AP5 (50  $\mu$ M), el antagonista de los receptores NMDA, la estimulación con 5-HT indujo una depresión persistente (30 min) de las EPSCs ( $0,54 \pm 0,09$  y  $0,84 \pm 0,05$ , respectivamente;  $n \geq 5$  células,  $N \geq 3$  ratones; prueba t de Student pareada,  $P \leq 0,010$ ) (Figura R24). Por su parte, la aplicación de MRS 2179 (10  $\mu$ M), un antagonista selectivo de los receptores purinérgicos tipo P2Y1, no alteró las respuestas sinápticas mediadas por 5-HT ( $1,08 \pm 0,04$ ,  $n=6$  células,  $N=2$  ratones; Prueba t de Student pareada,  $P = 0,086$ ) (Figura R24).



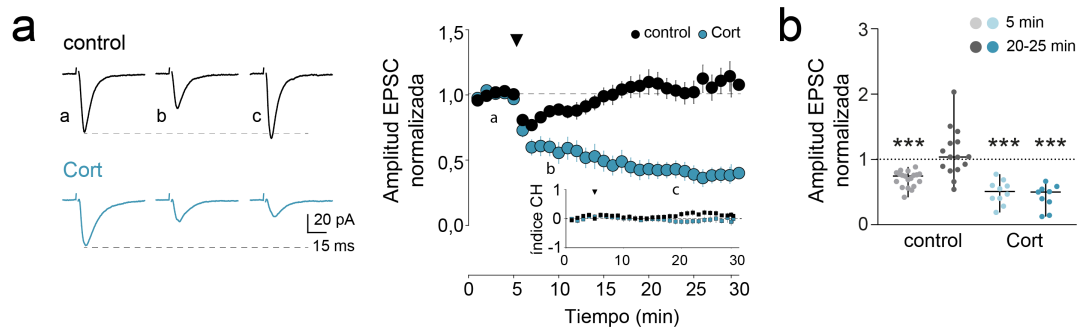
**Figura R24. Los receptores mGluR1 y NMDA contribuyen a la plasticidad sináptica evocada por 5-HT. a)** Izda, trazos representativos de EPSC registradas antes (a), 5 min (b) y 20-25 min (c) después de la estimulación con 5-HT (promedio de 20 respuestas consecutivas) en presencia de LY367385 (azul) y D-AP5 (gris). Dcha, amplitud normalizada de EPSCs e índice para el valor de corriente de la membrana (corriente de *holding*, CH) a lo largo del tiempo antes y después de la aplicación de un pulso de 5-HT (triángulo negro) en presencia de LY367385 ( $n=13$  células,  $N=6$  ratones), D-AP5 ( $n=18$  células,  $N=7$  ratones) y MRS 2179 ( $n=10$  células,  $N=5$  ratones). Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM. **b)** Gráfico de dispersión mostrando los cambios en la amplitud de EPSC registradas durante los primeros 5 min (efectos sinápticos a corto plazo) y después de 20-25 min de la estimulación con 5-HT (efectos sinápticos a largo plazo). \* $P < 0,05$ , \*\*\* $P < 0,001$ . Los datos se muestran como mediana  $\pm$  rango (valores mínimo y máximo).

En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que la estimulación con 5-HT puede activar la liberación de glutamato por parte de los astrocitos, a través de la activación de los receptores de la familia 5-HT<sub>2</sub>, que a su vez puede activar receptores neuronales mGluR1 y NMDA contribuyendo a la plasticidad sináptica evocada por 5-HT en CPFm.

## 9. La plasticidad sináptica inducida por 5-HT está alterada en el TD

Estudios previos ponen de manifiesto que el TD altera la transmisión sináptica excitadora y la plasticidad sináptica (Duman et al., 2016; Fullana et al., 2019b; Wang et al., 2023). Para testar el efecto del tratamiento con Cort sobre la señalización serotoninérgica, se registraron neuronas piramidales de capa 2/3 de CPFm en ratones Cort. De esta manera, el estímulo con 5-HT en los ratones Cort, al contrario que los ratones control, indujo una depresión de la transmisión sináptica excitadora de mayor magnitud y duración (30 min) ( $0,42 \pm 0,06$ ,  $n=9$  células,  $N=5$  ratones; Prueba t de Student pareada,  $P < 0,001$ ) (Figura R25). Sorprendentemente, esta

depresión sináptica resultó similar a la obtenida tras el bloqueo de la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en astrocitos (Figura R18), reforzando la relación entre la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitario y la plasticidad sináptica inducida por 5-HT, tanto en control como en el TD (Figura R10, apartado 5)



**Figura R25. La plasticidad sináptica evocada por 5-HT está alterada en la CPFm de ratones Cort.** a) Izda, trazos representativos de EPSC registradas antes (a), 5 min (b) y 20-25 min (c) después de la estimulación con 5-HT (promedio de 20 respuestas consecutivas) en ratones control (negro) y Cort (azul). Dcha, amplitud normalizada de EPSCs e índice para el valor de corriente de la membrana (corriente de *holding*, CH) a lo largo del tiempo antes y después de la aplicación de un pulso de 5-HT (triángulo negro) en ratones control (n=19 células, N=8 ratones) y Cort (n=10 células, N=5 ratones). Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM. b) Gráfico de dispersión mostrando los cambios en la amplitud de EPSC registradas durante los primeros 5 min (efectos sinápticos a corto plazo) y después de 20-25 min de la estimulación con 5-HT (efectos sinápticos a largo plazo) en ratones control y Cort. \*\*\*P < 0,001. Los datos se muestran como mediana  $\pm$  rango (valores mínimo y máximo).

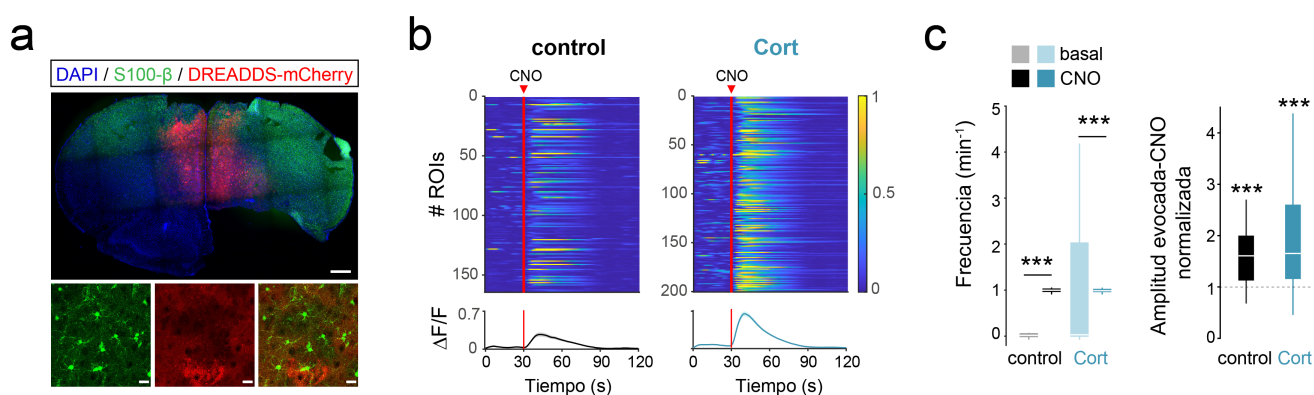
## 10. La activación selectiva de astrocitos con Gq-DREADDS revierte las alteraciones cognitivas presentes en el TD

### 10.1. La activación de Gq-DREADDS desencadena un aumento de las señales de $\text{Ca}^{2+}$ en ratones control y Cort

El TD se caracteriza no solo por las alteraciones afectivas y del estado de ánimo sino también por la afectación de habilidades cognitivas asociadas con la atención, las funciones ejecutivas y los procesos relacionados con el aprendizaje y la memoria (Uekermann et al., 2008; Beblo et al., 2011; Benke et al., 2021).

Se ha demostrado que los astrocitos, mediante estudios de la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  y la gliotransmisión, están involucrados en comportamientos relacionados con la respuesta al miedo condicionado (Martin-Fernandez et al., 2017), la toma de decisiones (Mederos et al., 2021), y la memoria de trabajo (Gordleeva et al., 2021). Considerando que los resultados obtenidos en esta tesis doctoral ponen de manifiesto la existencia de una alteración funcional en los astrocitos de ratones Cort, con dinámicas de  $\text{Ca}^{2+}$  reducidas *in vivo* y *ex vivo*, se quiso investigar si la potenciación de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante herramientas selectivas podría tener un impacto significativo en el rendimiento conductual de los ratones Cort.

Para ello, se inyectaron ratones control y Cort con el virus AAV5-GFAP-hM3D(Gq)-mCherry, que contiene DREADDS (Whissell et al., 2016) para ser expresado selectivamente en astrocitos de CPFm. Así, la presencia del agonista selectivo clozapina-N-óxido (CNO) puede activar receptores muscarínicos M3 modificados, que están asociados a proteínas Gq y desencadenan la activación de la vía IP3 generando como resultado un aumento de la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos. La aplicación de CNO (1 mM, 2s, 1 bar) indujo un aumento de las respuestas de  $\text{Ca}^{2+}$  de los astrocitos de CPFm de ratones control y Cort (Figura R26) (frecuencia:  $1,12 \pm 0,05 \text{ min}^{-1}$  en ratones control y  $1,03 \pm 0,02 \text{ min}^{-1}$  en ratones Cort,  $n=164$  ROIs,  $N= 3$  ratones y  $n=200$  ROIs,  $N=2$  ratones respectivamente; prueba t de Student pareada,  $P < 0,001$ ; amplitud:  $1,61 \pm 0,09$  en ratones control y  $1,88 \pm 0,12$  en ratones Cort; prueba t de Student pareada,  $P < 0,001$ ), confirmando así la validez de esta herramienta quimiogenética para incrementar la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos de CPFm.



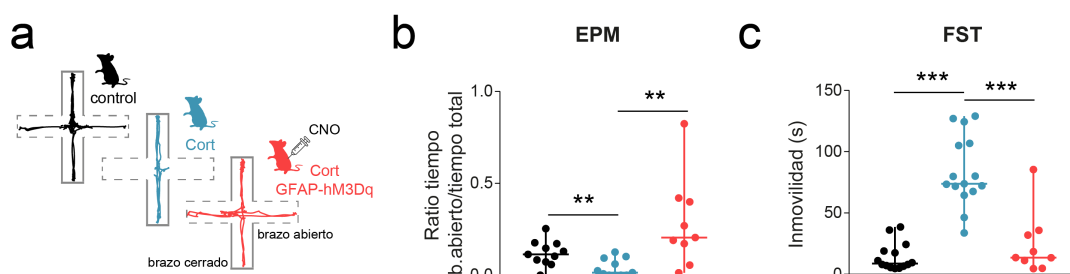
**Figura R26. GFAP-Gq-DREADDS induce un aumento en la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos de CPFm en ratones control y Cort.** **a)** Imágenes confocales mostrando la expresión de hM3D(Gq)-mCherry (rojo) en astrocitos (S100-β, verde). Escala: 500 μm (arriba), 50 μm (abajo). **b)** Gráfico representativo de la actividad basal y evocada por CNO de los ROIs y de la actividad promedio de astrocitos en ratones control ( $n = 164$ ,  $n = 3$  ratones) y Cort ( $n = 200$ ,  $n = 2$  ratones). El código de intensidad de color denota cambios de fluorescencia. Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM. **c)** Diagramas de cajas y bigotes representando las fluctuaciones de los eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos inducidos por CNO en ratones control y ratones Cort. Los valores de amplitud se normalizaron con respecto a la actividad espontánea antes de la estimulación. Ambos ratones mostraron un aumento en la amplitud normalizada evocada por CNO, prueba t de Student pareada,  $P < 0,001$ . \*\*\* $P < 0,001$ .

## 10.2. La activación de los astrocitos de CPFm en ratones Cort reduce los niveles de desesperanza y ansiedad a niveles control

Numerosos estudios muestran que el tratamiento crónico con Cort induce un aumento de la desesperanza y la ansiedad en roedores macho adultos, (Ferrés-Coy et al., 2015; Berger et al., 2019; Patel et al., 2021; Lin et al., 2022). En línea con estos estudios, se observó que los ratones Cort macho presentaban una disminución del tiempo de exploración de los brazos abiertos en el laberinto en cruz elevado (EPM) ( $0,04 \pm 0,01$  en ratones Cort frente a  $0,12 \pm 0,02$  en ratones control,  $N = 11$ ; ANOVA de una vía, test de Tukey;  $P=0,005$ ) (Figura R27a, b) y un aumento de la inmovilidad en el test de natación forzada (FST) ( $83,68 \pm 7,44$  s en ratones Cort macho frente a

14,33 ± 3,04 s en ratones control, N=15 y N=14 respectivamente; ANOVA de una vía, test de Dunn,  $P < 0,001$ ) con respecto a los ratones control (Figura R27c).

A continuación, se estudió si la manipulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos mediante Gq-DREADDS tenía un impacto en el comportamiento de los ratones Cort. Con este fin se inyectaron virus en la CPFm para expresar Gq-DREADDS en astrocitos en ratones control y Cort. Al cabo de 3 semanas, se administró el agonista CNO (3 mg/kg) mediante una inyección i.p. 20 min antes de la realización de las pruebas comportamentales. Sorprendentemente, se observó que la activación selectiva de los astrocitos de la CPFm por Gq-DREADDS disminuyó los niveles de ansiedad (de  $0,04 \pm 0,01$  en ratones Cort a  $0,28 \pm 0,08$  en ratones Cort-GFAP-hM3Dq, N=11 y N=9 respectivamente; ANOVA de una vía, test de Dunn;  $P = 0,003$ ) (Figura R27a, b) y la desesperanza en ratones Cort (de  $83,68 \pm 7,44$  s en ratones Cort a  $24,33 \pm 8,45$  s en ratones Cort-GFAP-hM3Dq, N=15 y N=9 respectivamente; ANOVA de una vía, test de Tukey;  $P < 0,001$ ) (Figura R27c).



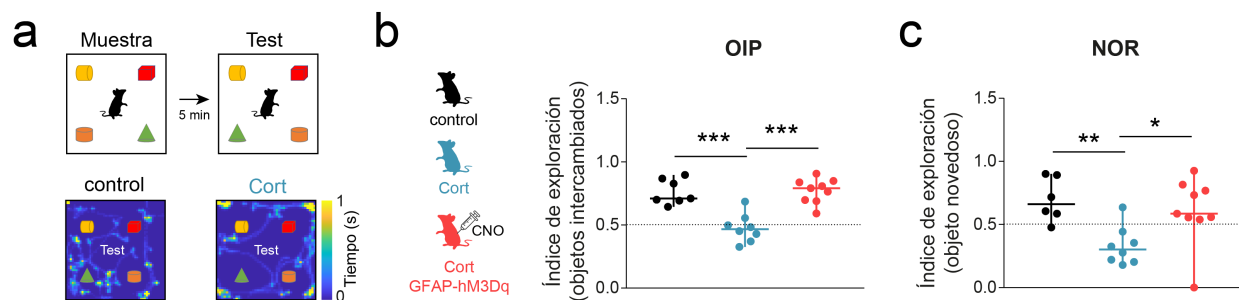
**Figura R27. La estimulación quimiogénica de astrocitos de CPFm revierte los niveles de desesperanza y ansiedad en ratones Cort.** **a)** Esquema del paradigma comportamental del laberinto en cruz elevado (EPM) para ratones control, Cort y Cort GFAP-hM3Dq. Los ratones Cort GFAP-hM3Dq fueron inyectados con CNO (3 mg/kg, i.p.) 20 min antes de la realización del test. Nótese que los ratones control y Cort GFAP-hM3Dq exploran los brazos abiertos del laberinto, a diferencia de los ratones Cort. **b)** Ratio del tiempo de exploración de los brazos abiertos sobre el tiempo de exploración total en el EPM. **c)** Tiempo de inmovilidad en el FST. Los ratones Cort-GFAP-hM3Dq mostraron una reducción del tiempo de inmovilidad (ANOVA de una sola vía, test de Tukey,  $P < 0,001$ ), alcanzando valores similares a los ratones control (ANOVA de una sola vía,  $P = 0,413$ ). \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ . Los datos se presentan como mediana ± rango.

### 10.3. La activación selectiva de astrocitos de CPFm potencia la memoria de trabajo en ratones Cort

La localización de objetos en un espacio o el reconocimiento de un objeto novedoso sobre otro conocido son test que evalúan el procesamiento cognitivo de los animales y el rendimiento en relación con la memoria de trabajo (Leger et al., 2013; Barker y Warburton, 2015; Wang et al., 2021a). Distintos hallazgos relacionan la administración crónica de Cort con alteraciones en la realización de tareas complejas que implican memoria de trabajo (McLay et al., 1998; Dominguez et al., 2019). Acorde con estos estudios, los resultados presentes en esta tesis doctoral muestran un deterioro cognitivo en ratones Cort macho en estas pruebas cognitivas (OIP:  $0,48 \pm 0,04$  en ratones Cort frente a  $0,76 \pm 0,04$  en ratones control, N=8 y N=7 respectivamente; ANOVA de una vía, test de Tukey,  $P < 0,001$ ; NOR:  $0,33 \pm 0,05$  en ratones Cort frente a  $0,70 \pm 0,07$  en ratones

control, N=8 y N=6 respectivamente; ANOVA de una vía, test de Holm-Sidak,  $P \leq 0,009$ ) (Figura R28).

Cabe destacar que la activación de los astrocitos de CPFm con Gq-DREADDS en ratones Cort macho consigue mejorar estos déficits cognitivos, alcanzando valores similares a los de ratones control, recuperando su capacidad para reconocer la localización de distintos objetos (de  $0,48 \pm 0,04$  a  $0,77 \pm 0,03$ ; ANOVA de una vía, test de Holm-Sidak,  $P < 0,001$  en el OIP) y de objetos novedosos (de  $0,33 \pm 0,05$  a  $0,61 \pm 0,09$ ; ANOVA de una vía, test de Holm-Sidak,  $P = 0,021$  en el NOR) (Figura R28).



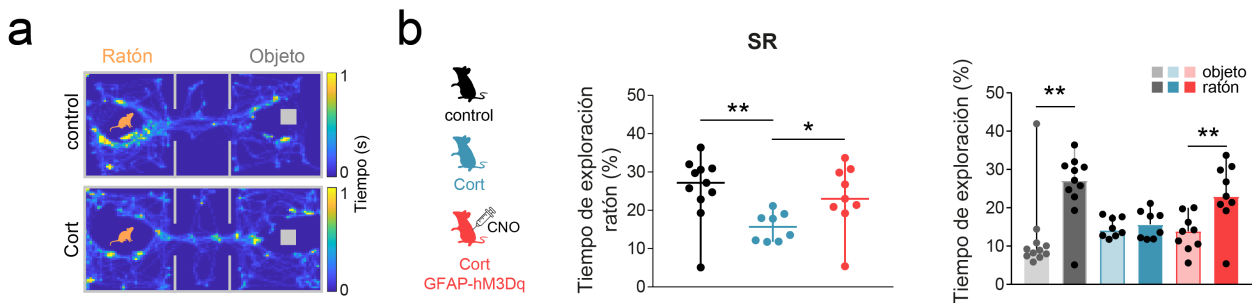
**Figura R28. La activación quimiogénica de astrocitos de CPFm mejora la memoria de trabajo en ratones Cort.** **a)** Esquema del paradigma comportamental del OIP (arriba) y gráfico de actividad representativo de la realización del test para los ratones control y Cort (abajo). El código de color indica el tiempo acumulado. Nótese que los ratones Cort no muestran una exploración preferente de los objetos intercambiados. **b, c)** Índice del tiempo de exploración de los objetos intercambiados o del objeto novedoso con respecto al tiempo de exploración total. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ . Los datos se presentan como mediana  $\pm$  rango.

#### 10.4. La activación selectiva de astrocitos de CPFm restaura la interacción social en ratones Cort

Estudios previos destacan que eventos estresantes durante la infancia y la adolescencia tienen un impacto crítico en la maduración cerebral y están relacionados con comportamientos posteriores de mal adaptación social y emocional (Spear et al., 2000; Pohl et al., 2007; Casey y Jones, 2010; Iñiguez et al., 2016), incluido el tratamiento con Cort (Veenit et al., 2013; Gadberry et al., 2022; Bertholomey et al., 2022).

En este contexto, se comprobó la existencia de alteraciones en la habilidad social de los ratones Cort macho mediante la realización del test de interacción social. Al contrario que los ratones control, se observó que los ratones Cort no presentaban una clara preferencia social, invirtiendo un tiempo similar en la exploración de un animal desconocido y un objeto ( $15,67 \pm 1,32\%$  exploración<sub>ratón</sub> frente a  $14,84 \pm 0,91\%$  exploración<sub>objeto</sub>, ANOVA de una vía, post hoc test de Dunn,  $P = 0,609$ ) (Figura R29).

Posteriormente, se quiso evaluar el impacto de la sobreactivación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en astrocitos de CPFm con quimiogénica sobre la interacción social. La estimulación selectiva de astrocitos dio lugar a un restablecimiento de la preferencia de los animales por interaccionar con ratones desconocidos frente a objetos inanimados ( $23,45 \pm 2,80\%$  exploración<sub>ratón</sub> frente a  $13,43 \pm 1,60\%$  exploración<sub>objeto</sub>; ANOVA de una vía, test de Dunn  $P = 0,001$ ) (Figura R29b).

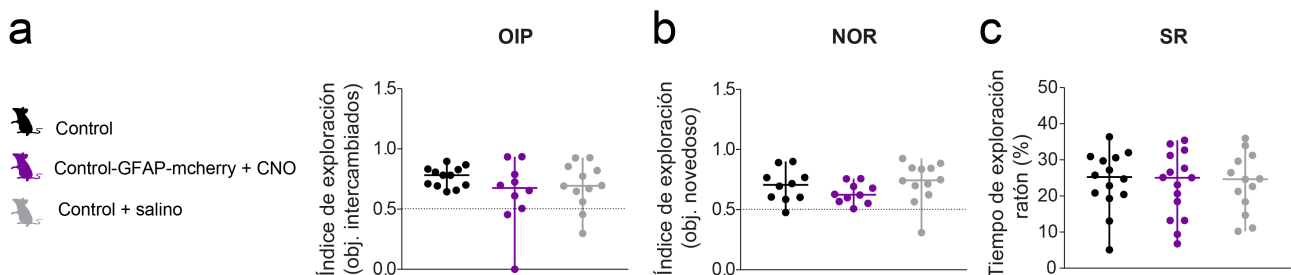


**Figura R29. La activación quimiogénica de astrocitos de CPFm restaura los niveles de interacción social en ratones Cort.** a) Gráfico de actividad representativo de la realización del test de interacción social para los ratones control y Cort. El código de color indica el tiempo acumulado. Nótese que los ratones Cort no interaccionan de manera preferente con el ratón desconocido. b) Tiempo de exploración del ratón (izda) o del ratón y el objeto (dcha) con respecto a la duración del test. Nótese que los niveles reducidos de interacción social observados en ratones Cort (ANOVA de una vía, test de Holm-Sidak,  $P = 0,004$ ) fueron revertidos por la administración de CNO (ANOVA de una vía, método de Dunn,  $P = 0,030$ ). \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ . Los datos se presentan como mediana  $\pm$  rango.

En conjunto, todos estos resultados muestran como la manipulación selectiva de la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos de la CPFm es capaz de contrarrestar la principal sintomatología que caracteriza el TD en ratones Cort macho.

### 10.5. La presencia de CNO *per se* no afecta a la locomoción, cognición y sociabilidad de los animales

El CNO puede convertirse en clozapina (Manvich et al., 2018) y activar numerosos receptores monoaminérgicos, lo que podría inducir algún tipo de cambio en el comportamiento. Por tanto, se comprobó que inyecciones de CNO aisladas (en ausencia de DREADDS) en ratones transfectados con el virus AAV5-GFAP-mCherry no indujeron efectos secundarios significativos (Gomez et al., 2017). De este modo, el CNO *per se* no modificó el rendimiento cognitivo y la interacción social de los animales (Figura R30), mostrando valores similares a los obtenidos en ratones control tratados con solución salina o sin experimentar las manipulaciones propias de las inyecciones virales intracraneales (Figura R30).

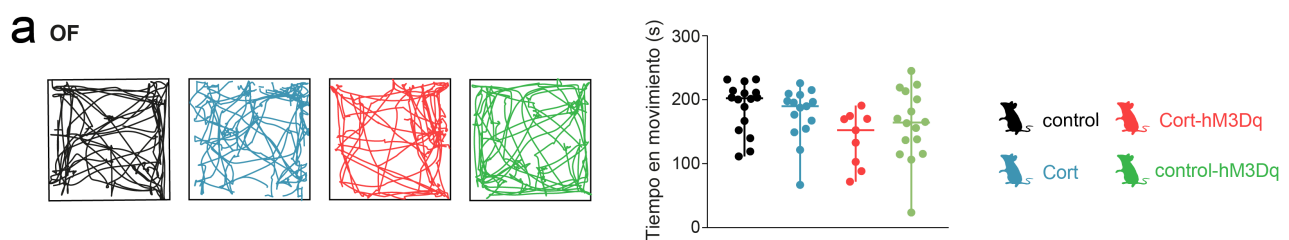


**Figura R30. CNO *per se* no induce cambios en las habilidades cognitivas y sociales de ratones control.** a) Índice del tiempo de exploración de los objetos intercambiados con respecto al tiempo de exploración total, en



ratones silvestres (Control), ratones control infectados con el vector GFAP-mcherry e inyectados con CNO (3 mg/kg, i.p.) (Control-GFAP-mcherry + CNO), y ratones control inyectados con solución salina (Control + salino) 20 min antes de la realización de la prueba comportamental. **b)** Índice del tiempo de exploración del objeto novedoso con respecto al tiempo de exploración total en ratones Control, Control-GFAP-mcherry + CNO y Control + salino. **c)** Tiempo de exploración del ratón desconocido con respecto a la duración del test en los distintos grupos. Nótese que el rendimiento cognitivo y la interacción social está preservado en ratones control-GFAP-mcherry después de la inyección i.p. de CNO, obteniendo valores similares en estas pruebas a los de los ratones control. ANOVA de una vía,  $P > 0,05$ . Los datos se muestran como mediana  $\pm$  rango (valores mínimo y máximo).

Asimismo, y en línea con otros estudios, se comprobó que los ratones inyectados con CNO no presentaban ningún problema motor en la prueba de OF (Figura R31) (ANOVA de una vía,  $P > 0,286$ ) (Tran et al., 2020; Aomine et al., 2024).

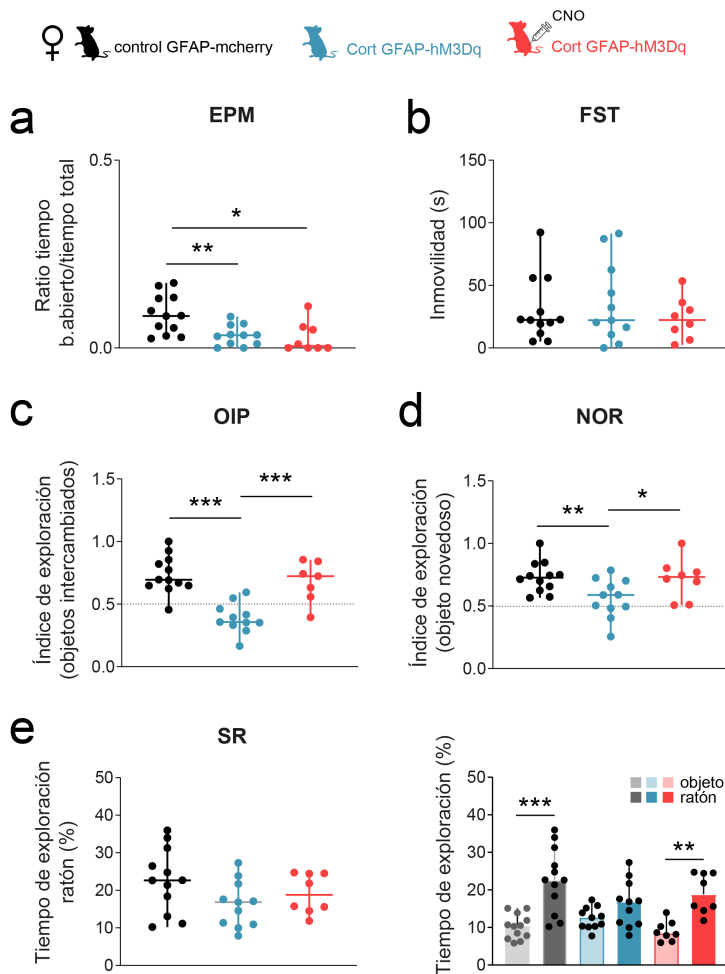


**Figura R31. La activación quimiogénica de astrocitos de CPFm no induce cambios en la locomoción. a)** Izda, ensayo representativo de la realización del test de campo abierto en ratones control, Cort, Cort-hM3Dq y control-hM3Dq. Dcha, cuantificación del tiempo total de movimiento en el test de campo abierto (OF). Nótese que la movilidad de los ratones no se vio significativamente afectada entre los grupos experimentales. ANOVA de una vía, método de Dunn,  $P > 0,05$ . Los datos se presentan como mediana  $\pm$  rango (valores mínimo y máximo).

## 10.6. La activación de astrocitos de CPFm restaura los déficits cognitivos y sociales del TD en hembras

El TD presenta una mayor prevalencia en hembras (McLean et al., 2011; Williams et al., 2022). Distintos estudios han explorado el efecto del tratamiento con Cort en hembras, encontrando una variabilidad de respuestas en el rendimiento conductual de estos ratones, así como diferencias sexuales con respecto a los ratones Cort macho (Berger et al., 2019; Bertholomey et al., 2022). En este contexto, se estudió si la manipulación de astrocitos de CPFm en ratones Cort hembra, al igual que en los ratones Cort macho, tenía un impacto positivo en el comportamiento. Como resultado, se observó que los ratones Cort hembra presentaban una disminución del tiempo de exploración de los brazos abiertos en el EPM con respecto a los ratones control ( $0,03 \pm 0,01$  en ratones Cort hembra frente a  $0,09 \pm 0,01$  en ratones hembra control,  $N = 11$  y  $N = 12$  respectivamente; ANOVA de una vía, test de Holm-Sidak;  $P = 0,005$ ) (Figura R32a). Sin embargo, el tratamiento con Cort no provocó un aumento de inmovilidad en el FST ( $35,46 \pm 9,68$  s en ratones Cort frente a  $30,21 \pm 7,37$  s en ratones control,  $N = 11$  y  $N = 12$  respectivamente; ANOVA de una vía, prueba de Kruskal-Wallis,  $P = 1,000$ ) (Figura R32b) como ocurría en ratones Cort macho (Figura R27c).





**Figura R32. La activación de astrocitos de CPFm revierte los déficits cognitivos y sociales en ratones Cort hembra. a)** Ratio de tiempo de exploración de los brazos abiertos sobre el tiempo de exploración total en el EPM en ratones control infectados con vector (control GFAP-mcherry), ratones Cort infectados con Gq-DREADDS (Cort-GFAP-hM3Dq) y ratones Cort infectados con Gq-DREADDS e inyectados con CNO (Cort-GFAP-hM3Dq + CNO). Se utilizaron los mismos grupos experimentales para el resto de las pruebas comportamentales de la figura. Los datos se presentan como mediana  $\pm$  rango (valores mínimo y máximo) para toda la figura. **b)** Tiempo de inmovilidad en el FST, **c,d)** Índice del tiempo de exploración de los objetos intercambiados o del objeto novedoso con respecto al tiempo de exploración total. **e)** Tiempo de exploración del ratón (izda) o del ratón y el objeto (dcha) con respecto a la duración total del test. \* $<0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

Por otro lado, el tratamiento con Cort sí provocó un deterioro de las capacidades cognitivas en los test OIP y NOR (OIP:  $0,39 \pm 0,04$  en ratones Cort frente a  $0,73 \pm 0,04$  en ratones control,  $N=11$  y  $N=12$  respectivamente; ANOVA de una vía, test de Holm-Sidak,  $P<0,001$ ; NOR:  $0,56 \pm 0,05$  en ratones Cort frente a  $0,73 \pm 0,04$  en ratones control,  $N=11$  y  $N=12$  respectivamente; ANOVA de una vía, test de Holm-Sidak;  $P=0,009$ ), así como una disfunción en la interacción social en el test SR ( $16,30 \pm 1,85\%$  exploración<sub>ratón</sub> frente a  $12,49 \pm 0,87\%$  exploración<sub>objeto</sub>; ANOVA de una vía,  $P=0,302$ ).

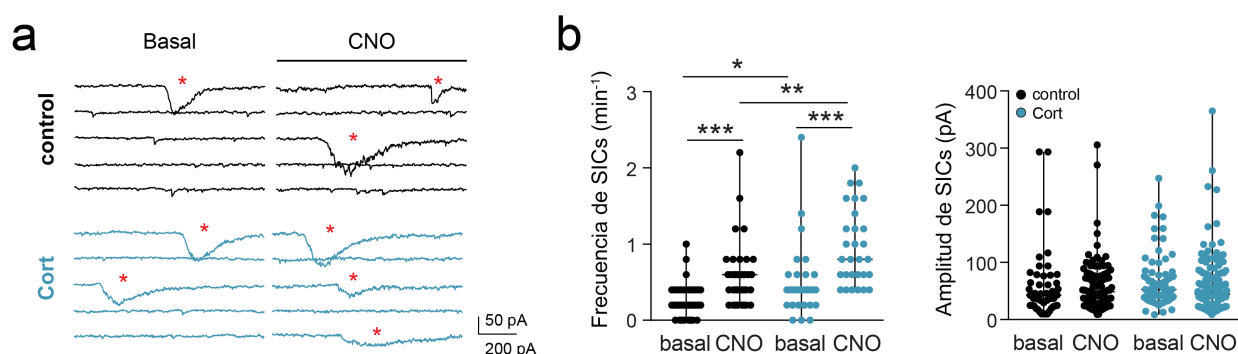
Una vez establecido el impacto del tratamiento con Cort en hembras, se evaluó el efecto de la activación de Gq-DREADDS en astrocitos de CPFm en la realización de estos test comportamentales. Como resultado, se observó que al contrario que en los ratones Cort macho, en las hembras la activación selectiva de los astrocitos no promovió un efecto beneficioso sobre la ansiedad y la desesperanza de los ratones en el EPM y FST, respectivamente (Figura R32a, b). En cambio, esta estrategia fue exitosa en revertir los déficits cognitivos observados en el OIP (de  $0,39 \pm 0,04$  a  $0,68 \pm 0,06$ ; ANOVA de una vía, test de Tukey,  $P<0,001$ ) y NOR (de  $0,56 \pm 0,05$  a  $0,72 \pm 0,06$ ; ANOVA de una vía, test de Holm-Sidak,  $P=0,046$ ) (Figura R32c, d), como en

reestablecer las habilidades sociales en el SR ( $19,17 \pm 1,86\%$  exploración<sub>ratón</sub> frente a  $9,05 \pm 0,94\%$  exploración<sub>objeto</sub>; ANOVA de una vía, test de Dunn/test de Tukey  $P=0,001$ ) (Figura R32e).

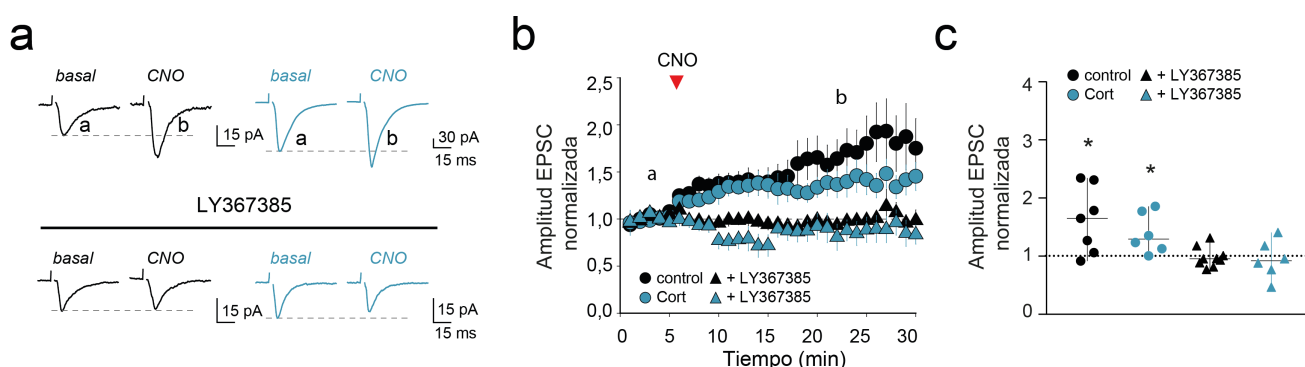
Así, estos resultados muestran que, aunque existen diferencias sexuales en el efecto de Gq-DREADDS sobre astrocitos de ratones Cort macho y hembra, esta estrategia consigue revertir los principales síntomas cognitivos y sociales del TD en ratones hembra.

### 10.7. La activación selectiva de astrocitos de CPFm estimula la gliotransmisión y la transmisión sináptica

Una vez conocido el potencial terapéutico de la activación de astrocitos en CPFm para el TD, se analizaron las consecuencias de esta manipulación sobre la gliotransmisión. Para ello, se realizaron registros electrofisiológicos *ex vivo* en neuronas de capa 2/3 de la CPFm y se aplicaron pulsos de presión de CNO (1 mM, 2 s, 1 bar). En estas condiciones, la estimulación de astrocitos desencadenó un aumento de la frecuencia de las SICs mediadas por la activación del receptor NMDA, siendo mayor en ratones Cort ( $0,95 \pm 0,09 \text{ min}^{-1}$  en ratones Cort + CNO frente a  $0,60 \pm 0,07 \text{ min}^{-1}$  en ratones control + CNO,  $n=29$  y  $n=35$  células,  $N=3$  y  $N=4$  respectivamente; ANOVA de una vía, test de Dunn;  $P=0,002$ ) (Figura R33). Estos datos apoyan los resultados previos de esta tesis, confirmando la capacidad de los astrocitos para liberar glutamato/D-serina, causando un aumento de la excitabilidad neuronal. Además, estos resultados indican que, al contrario de lo observado con 5-HT, el tratamiento con Cort no producía déficits en la capacidad de gliotransmisión inducida por DREADDS.

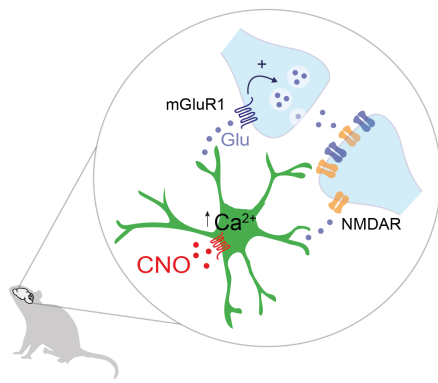


Del mismo modo, se analizó el efecto de la activación por DREADDS de astrocitos en la transmisión sináptica. El estudio de las EPSCs reveló que tras la estimulación con CNO, se producía una potenciación de la transmisión sináptica excitadora en ratones control y Cort de larga duración y magnitudes similares ( $1,62 \pm 0,22$  en control,  $1,39 \pm 0,14$  en Cort,  $n \geq 6$  células y  $N \geq 3$  ratones; prueba t de Student pareada,  $P < 0,05$ ) (Figura R34). Retomando los resultados obtenidos con la estimulación de 5-HT, se quiso analizar la posibilidad de un mecanismo similar y se analizó la contribución de los receptores mGluR1 en esta plasticidad sináptica. En presencia del antagonista de los receptores mGluR1, LY367385 ( $100 \mu\text{M}$ ), no se produjo potenciación alguna de las EPSCs inducida por la activación de los astrocitos con Gq-DREADDS ( $0,98 \pm 0,06$  en ratones control y  $0,94 \pm 0,13$  en ratones Cort,  $n \geq 6$  células y  $N \geq 3$  ratones; prueba t de Student pareada,  $P > 0,05$ ) (Figura R34).



**Figura R34. La activación quimiogenética de astrocitos de CPFm potencia la transmisión sináptica excitadora en ratones control y Cort.** **a)** Trazos representativos de EPSC registradas antes (a) y 20-25 min (b) después de la estimulación con CNO (promedio de 20 respuestas consecutivas) en ratones control (negro) y Cort (azul) en condiciones basales (arriba) y en presencia de LY367385 (abajo). **b)** Amplitud normalizada de EPSCs a lo largo del tiempo antes y después de la activación de astrocitos con Gq-DREADDS en ratones control ( $n=9$  células,  $N=6$  ratones), Cort ( $n=7$  células,  $N=3$  ratones), control en presencia de LY367385 (+LY367385 triángulo negro,  $n=12$  células,  $N=4$  ratones), y Cort en presencia de LY367385 (+LY367385 triángulo azul,  $n=11$  células,  $N=3$  ratones). Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM. **c)** Gráfico de dispersión mostrando los cambios en la amplitud de EPSC registradas 25 min después de la aplicación de CNO. Nótese que la activación de astrocitos con Gq-DREADDS indujo una potenciación persistente de las EPSCs en ratones control y Cort (prueba t de Student pareada,  $P=0,028$ ,  $P=0,039$  respectivamente) que desaparece en presencia de LY367385 (prueba t de Student pareada,  $P= 0,752$ ,  $P= 0,694$  respectivamente). \* $P < 0,05$ . Los datos se muestran como mediana  $\pm$  rango (valores mínimo y máximo).

En conjunto, estos datos muestran como los astrocitos, a través de la estimulación con Gq-DREADDS, son capaces de facilitar la transmisión glutamatérgica a través de la activación presináptica de los receptores mGluR1 (Perea y Araque 2007; Gómez-Gonzalo et al., 2015; Nam et al., 2019). Es decir, la estimulación con CNO puede inducir un aumento de la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos, que a su vez desencadenaría la liberación de gliotransmisores, como el glutamato y/o D-serina, que pueden activar receptores mGluR1 y NMDA neuronales, entre otros, promoviendo plasticidad sináptica en los circuitos corticales (Figura R35).

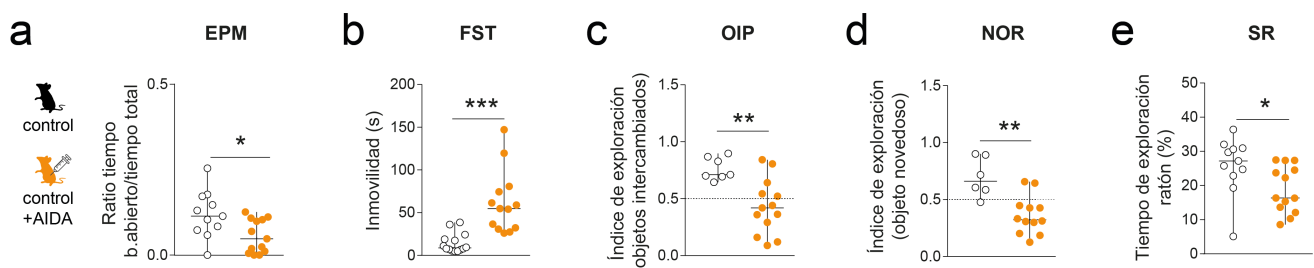


**Figura R35. Mecanismo de acción propuesto tras la activación de Gq-DREADDs en astrocitos de CPFm.** a) Representación de la estimulación de los receptores hM3Dq (rojo) en astrocitos (verde) mediante la aplicación local de CNO (círculos rojos). Esta estimulación induce un aumento en la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos pudiendo generar la liberación de glutamato (círculos azules) como gliotransmisor, que puede activar receptores mGluR1 y NMDA neuronales contribuyendo a la potenciación de la transmisión sináptica excitadora.

## 10.8. La inhibición sistémica del receptor mGluR1 en ratones Cort impide la recuperación del fenotipo depresivo

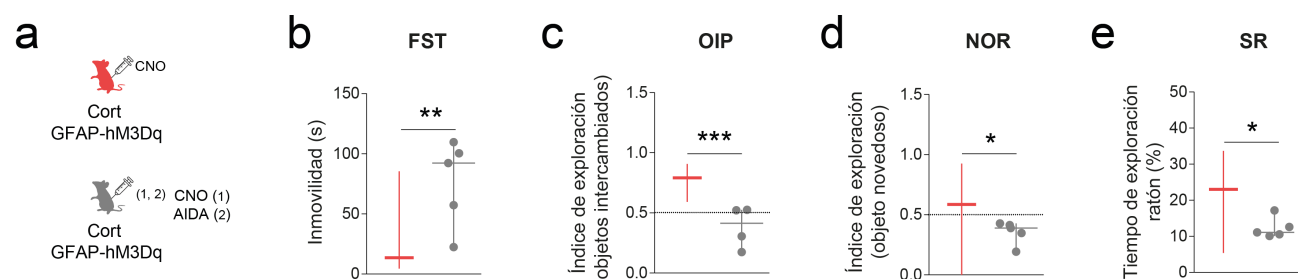
Estudios previos han descrito un papel crítico del receptor mGluR1 en funciones ejecutivas, como la toma de decisiones (Sun y Neugebauer 2011; Mederos et al., 2021). Considerando el impacto de Gq-DREADDs sobre la transmisión sináptica excitadora y el control de esta respuesta por parte de los receptores mGluR1, se estudió la implicación de estos receptores en la mejora del comportamiento de los animales Cort tras la manipulación de astrocitos.

Primero se estudió el efecto de la administración sistémica del ácido 1-aminoindan-1,5-dicarboxílico (AIDA, 5 mg/kg i.p.) un antagonista selectivo de mGluR1 en ratones control. Estos experimentos mostraron que la presencia de AIDA ejercía un impacto negativo sobre el comportamiento, induciendo un aumento en los niveles de ansiedad (ratio exploración brazos abiertos: de  $0,12 \pm 0,02$  en ratones control a  $0,06 \pm 0,01$  en ratones control+AIDA,  $N=11$  y  $N=13$  respectivamente, ANOVA de una vía, test de Tukey,  $P=0,014$ ) e incrementando el tiempo de inmovilidad en el FST (de  $14,33 \pm 3,04$  s en ratones control a  $61,86 \pm 10,18$  en ratones control+AIDA,  $N=14$  y  $N=13$  respectivamente, ANOVA de una vía, test de Dunn,  $P<0,001$ ) (Figura R36a, b). Además, estos ratones mostraban una alteración en la ejecución de tareas cognitivas (test de localización de objetos: de  $0,76 \pm 0,04$  en ratones control a  $0,43 \pm 0,07$  en ratones control+AIDA,  $N=7$  y  $N=13$  respectivamente, ANOVA de una vía, test de Tukey,  $P=0,003$ ) y una disfunción en sus habilidades sociales (de  $25,88 \pm 2,52\%$  en ratones control a  $18,87 \pm 1,90$  en ratones control+AIDA,  $N=11$  y  $N=13$  respectivamente, ANOVA de una vía, test de Tukey,  $P=0,034$ ) (Figura R36c-e).



**Figura R36. El bloqueo del receptor mGluR1 empeora el rendimiento conductual en los ratones control.** **a)** Ratio de tiempo de exploración de los brazos abiertos sobre el tiempo de exploración total en el EPM en ratones control (blanco) y ratones inyectados i.p. con AIDA (control + AIDA, naranja). Los datos se presentan como mediana  $\pm$  rango (valores mínimo y máximo) para toda la figura. **b)** Tiempo de inmovilidad en el FST. **c,d)** Índice del tiempo de exploración de los objetos intercambiados o del objeto novedoso con respecto al tiempo de exploración total. **e)** Tiempo de exploración del ratón desconocido con respecto a la duración del test. \* $<0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

A la vista de estos resultados, se estudió el efecto de AIDA sobre el comportamiento de ratones Cort tras la activación selectiva de los astrocitos mediante el uso de Gq-DREADDS. La administración de AIDA bloqueó el efecto beneficioso de Gq-DREADDS sobre las tareas conductuales de los ratones Cort (Figura R37), respaldando con ello la estrecha relación entre la señal de  $Ca^{2+}$  en los astrocitos y la gliotransmisión glutamatérgica con las habilidades cognitivas (Mederos et al., 2021).

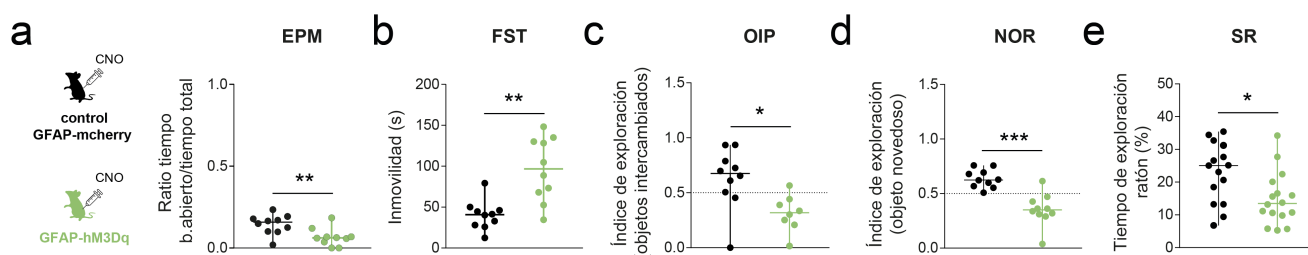


**Figura R37. El bloqueo del receptor mGluR1 previene las mejoras conductuales inducidas por la activación quimiogénica de astrocitos en ratones Cort.** **a)** Esquema de la administración i.p. de CNO (3 mg/kg) y AIDA (5 mg/kg) en ratones Cort infectados con Gq-DREADDS (Cort GFAP-hM3Dq). 1 y 2 indican inyecciones i.p. secuenciales. **b)** Tiempo de inmovilidad en el FST mostrando valores aumentados para los ratones Cort-GFAP-hM3Dq+AIDA (gris) en comparación con los ratones Cort-GFAP-hM3Dq (rojo, presentado como mediana  $\pm$  rango como referencia). ANOVA de una vía, test de Tukey,  $P = 0,008$ . Los datos se presentan como mediana  $\pm$  rango (valores mínimo y máximo) para toda la figura. **c, d, e)** La administración de AIDA promovió una reducción de los índices de exploración en los test OIP y NOR, y del tiempo de exploración en el test SR en ratones Cort GFAP-hM3Dq. ANOVA de una vía, test de Tukey,  $P \leq 0,001$  para OIP; test de Dunn,  $P = 0,020$  para NOR; test de Dunn,  $P = 0,015$  para SR. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

## 10.9. En condiciones fisiológicas el aumento de la señalización de $Ca^{2+}$ en astrocitos de CPFm recrea las alteraciones asociadas al TD

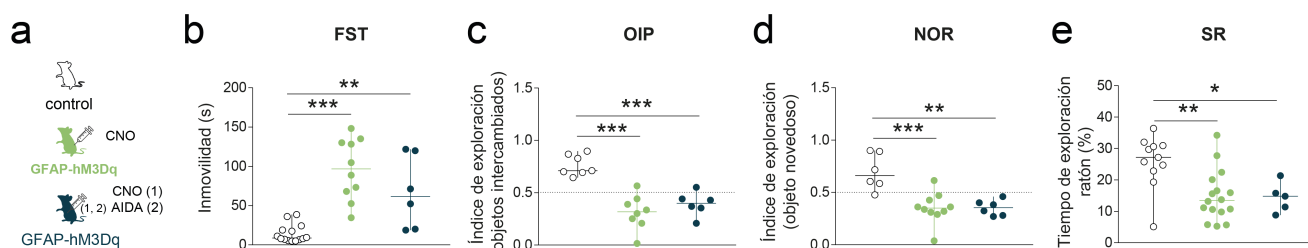
Considerando el efecto beneficioso de la activación selectiva de astrocitos de CPFm mediante Gq-DREADDS, para revertir las alteraciones comportamentales asociadas al TD, se propuso estudiar si también tenía efecto en ratones control potenciando sus habilidades cognitivas. Siguiendo la misma estrategia descrita para los ratones Cort, se encontró que la estimulación con CNO de los astrocitos de la CPFm mediante la expresión de Gq-DREADDS afectaba negativamente al desarrollo de las tareas comportamentales analizadas. De esta manera, los ratones control mostraron resultados negativos en las pruebas de comportamiento, mostrando un aumento de los niveles de desesperanza (de  $40,12 \pm 5,63$  s en ratones control a  $96,36 \pm 12,27$  s en ratones control-DREADDS;  $n=10$ ; ANOVA de una vía, test de Tukey  $P=0,002$ ), y en los niveles de

ansiedad (de  $0,14 \pm 0,02$  en ratones control a  $0,07 \pm 0,02$  en ratones control-DREADDS; ANOVA de una vía, test de Holm-Sidak  $P=0,007$ ); así como una disfunción de las habilidades cognitivas (de  $0,64 \pm 0,03$  a  $0,35 \pm 0,05$  en NOR; ANOVA de una vía, test de Tukey  $P<0,001$ ), y de interacción social (de  $21,60 \pm 2,54$  % a  $14,91 \pm 2,01$ %; ANOVA de una vía, test de Tukey  $P=0,015$ ) (Figura R38). Por tanto, lejos de potenciar las habilidades cognitivas, el uso de Gq-DREADDS en astrocitos de CPFm provocaba serios déficits comportamentales, similares a los encontrados en los ratones Cort.



**Figura R38. La activación quimiogénica de astrocitos de CPFm en ratones control recapitula las alteraciones conductuales asociadas al TD.** **a)** Ratio de tiempo de exploración de los brazos abiertos sobre el tiempo de exploración total en el EPM en ratones control infectados con vector (control GFAP-mcherry, negro) y ratones control infectados con Gq-DREADDS (control GFAP-hM3Dq, verde), ambos grupos inyectados i.p. con CNO. Los datos se presentan como mediana ± rango (valores mínimo y máximo) para toda la figura. Nótese que la administración de CNO en ratones control GFAP-hM3Dq redujo el tiempo de exploración de los brazos abiertos (ANOVA de una vía, test de Holm-Sidak,  $P = 0,007$ ). **b)** Tiempo de inmovilidad en el FST. La activación de los astrocitos en ratones GFAP-hM3Dq promovió un aumento de la inmovilidad en el FST (ANOVA de una vía, test de Tukey,  $P = 0,002$ ). **c, d)** Índice del tiempo de exploración de los objetos intercambiados o del objeto novedoso con respecto al tiempo de exploración total. **e)** Tiempo de exploración del ratón desconocido con respecto a la duración del test. Nótese que la administración de CNO redujo la memoria de trabajo (OIP, NOR) y el tiempo de interacción social (SR) en ratones GFAP-hM3Dq. ANOVA de una vía, test de Tukey,  $P = 0,011$  para OIP; test de Dunn,  $P < 0,001$  para NOR; test de Tukey,  $P = 0,015$  para SR. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

Finalmente, se analizó el papel del receptor mGluR1 en las alteraciones comportamentales inducidas por Gq-DREADDS en astrocitos de ratones control, observándose que la presencia a nivel sistémico de AIDA no alteraba estos efectos (Figura R39).



**Figura R39. El bloqueo del receptor mGluR1 no afecta a los déficits conductuales inducidos por la activación quimiogénica de astrocitos en ratones control.** **a)** Esquema de los grupos experimentales utilizados, ratones silvestres (control, blanco), ratones control infectados con Gq-DREADDS e inyectados con CNO (GFAP-hM3Dq, verde) y ratones control infectados con Gq-DREADDS e inyectados secuencialmente con CNO y AIDA (GFAP-hM3Dq, azul). **b)** Tiempo de inmovilidad en el FST mostrando valores aumentados en ratones inyectados con CNO (ANOVA de una vía, test de Dunn,  $P<0,001$ ) y secuencialmente con CNO y AIDA (ANOVA de una vía, test de Dunn,  $P=0,004$ ). Los datos se presentan como mediana ± rango (valores mínimo y máximo) para toda la figura.

**c,d)** Índice del tiempo de exploración de los objetos intercambiados o del objeto novedoso con respecto al tiempo de exploración total. **e)** Tiempo de exploración del ratón desconocido con respecto a la duración del test. Nótese que la administración de CNO y CNO+AIDA redujo la memoria de trabajo (OIP, NOR) y el tiempo de interacción social (SR) en ratones GFAP-hM3Dq. ANOVA de una vía, test de Holm-Sidak,  $P < 0,05$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .







# - CAPÍTULO V - DISCUSIÓN

---



## V. Discusión

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral muestran, por primera vez, la disfunción en la comunicación serotoninérgica entre neuronas y astrocitos en un modelo murino de TD.

Este modelo, basado en un tratamiento con Cort en ratones jóvenes, induce alteraciones significativas en el comportamiento animal, recapitulando aspectos cognitivos y del estado de ánimo propios del TD de acuerdo con estudios previos (Gourley y Taylor 2009; Ferrés-Coy et al., 2015). De esta manera, se constató que los ratones Cort macho presentaban un aumento de los niveles de ansiedad, de la desesperanza y alteraciones cognitivas y sociales, recapitulando así la mayoría de los endofenotipos relacionados con el TD según el sistema actual *Research Domain Criteria* (RDoC) (Anderzhanova et al., 2017), es decir, un aumento de los comportamientos de valencia negativa (Gourley y Taylor 2009; Ferrés-Coy et al., 2015), una pérdida de comportamientos de valencia positiva (Ferrés-Coy et al., 2015; Dieterich et al., 2019) y la disminución de las habilidades sociales y cognitivas (Lui et al., 2017; Zhao et al., 2022), revelándose como un protocolo experimental adecuado para estudiar las consecuencias conductuales de enfermedades relacionadas con el estrés crónico. Como se ha descrito en la Introducción de esta tesis doctoral (ver apartado 3.1) diferentes protocolos de estrés crónico también se utilizan comúnmente para estudiar fenotipos de ansiedad y depresión en la investigación animal, incluyendo el modelo de estrés crónico leve y los modelos de estrés psicosocial (Golden et al., 2011; Willner 2016). Si comparamos el modelo utilizado con estos otros modelos de TD utilizados en roedores, es preciso resaltar que la principal limitación de los modelos de suplementación con corticosteroides reside en su naturaleza farmacológica, que descuida el entorno en el que se encuentran los sujetos experimentales y limita toda la respuesta del eje HPA (que incluye CRH, pro-opiomelanocortina, ACTH y receptores para corticosteroides, entre otros) a la hormona del estrés, Cort. Sin embargo, a pesar de estas limitaciones, los protocolos de administración de Cort ofrecen un procedimiento reproducible en el que la exposición a los corticosteroides puede controlarse en términos de dosis y tiempo (Macrì 2017), con un efecto persistente tras finalizar el tratamiento y, adicionalmente, el efecto de este tratamiento se puede revertir mediante la utilización de antidepresivos (Gourley y Taylor 2009).

Los resultados aquí presentados muestran en primer lugar un aumento de la complejidad de los astrocitos, reflejada a través de una mayor ramificación, número y longitud de sus procesos, en ratones sometidos a un tratamiento con Cort. Este resultado difiere en gran parte de los obtenidos en tejidos post mortem de pacientes con TD o en modelos animales de TD, en los que registran la presencia de una atrofia astrocitaria (Davis et al., 2002; Miguel-Hidalgo et al., 2010; Zhao et al., 2018; O'Leary y Mechawar 2021; Lin et al., 2023). Son necesarios, por tanto, más experimentos para esclarecer estas discrepancias, sin embargo, se puede hipotetizar que los diferentes niveles de Cort presentes en el cerebro en distintas etapas puedan estar participando de estas diferencias. Así, ratones sometidos a un estrés agudo (20 min realizando el test de natación forzada), donde la Cort no ha alcanzado una concentración efectiva en cerebro, muestran una hipertrofia en los astrocitos del hipocampo (Murphy-Royal et al., 2020). Otros

tratamientos crónicos con Cort que resultan en niveles elevados de glucocorticoides en suero al final del tratamiento se relacionan con la presencia de una atrofia en los astrocitos (Zhang et al., 2015; Zhao et al., 2018). Por ello, las variaciones en la concentración de Cort en suero en los distintos modelos animales podría ocasionar diferencias en la morfología de los astrocitos. Además, existe la teoría de la inflamación crónica contemplada como una de las causas del TD (Duman et al., 2016; Liu et al., 2017; Westfall et al., 2021), lo que podría explicar la hipertrofia de los astrocitos como respuesta a la existencia de una reactividad astrocitaria. Distintas evidencias sugieren que ante condiciones de estrés o en el TD podría darse una astrogliosis que podría desencadenar a su vez un aumento en la expresión de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias (Torres-Platas et al., 2011; Novakovic et al., 2023). Serían necesarios nuevos experimentos para confirmar la presencia de reactividad astrocitaria en el modelo de TD utilizado en esta tesis.

Los cambios en la morfología de los astrocitos asociadas al tratamiento con Cort van acompañados de una disfunción en la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en estas células, y correlacionan con las alteraciones conductuales. Este resultado resulta de gran interés teniendo en cuenta que, hasta el momento, la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos ha sido poco explorada en relación con el TD. En cambio, en otras condiciones patológicas como la enfermedad de Alzheimer, el trastorno por consumo de alcohol, el trastorno del espectro autista, la enfermedad de Huntington o el síndrome de Down sí se ha reportado una disfunción de la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos (Jiang et al., 2016; Mizuno et al., 2018; Erickson et al., 2020; Larramona-Arcas et al., 2020; Shah et al., 2022; Coulter et al., 2023).

En los resultados obtenidos en esta tesis, se ha observado que, durante el comportamiento exploratorio de los ratones en un campo abierto, los ratones Cort mostraron una hiperexcitabilidad de la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos de CPFm evidenciada por un aumento en la frecuencia y magnitud de los eventos de  $\text{Ca}^{2+}$ . En cambio, durante la interacción social (test de exploración de un objeto y un animal desconocidos), comportamientos que involucran la actividad de la CPFm (Schaefer et al., 2006; Smoski et al., 2009), la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos se redujo significativamente, en línea con la presencia de bajos niveles de exploración y ausencia de preferencia social en estos ratones. Sin embargo, durante las exploraciones del objeto, los ratones control y Cort mostraron tiempos de exploración similares, y amplitudes de los eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  indistinguibles entre ellos (Figura R12), lo que sugiere, por un lado, la participación específica de las redes astrocitarias de la CPFm durante comportamientos sociales, y por otro, las diferencias en las dinámicas de  $\text{Ca}^{2+}$  asociadas al tipo de interacción (objeto/animal) permiten hipotetizar que los astrocitos de CPFm pueden codificar el valor etiológico de la exploración, siendo éstas más relevantes durante las interacciones sociales. Además, estos resultados, junto con otros realizados en este campo, ponen de manifiesto la importancia de niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  adecuados en astrocitos de CPFm y su relación con la interacción social (Wang et al., 2021b; Luo et al., 2023).

Los resultados recogidos en la presente tesis confirman la disfunción en la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  basal en los astrocitos de CPFm tanto a nivel poblacional (registros *in vivo*) como de célula individual (registros *ex vivo*). No obstante, es importante recalcar que estos resultados proceden de aproximaciones experimentales diferentes, en los que la participación neuronal está reducida en los registros *ex vivo* mediante la presencia de TTX, lo que podría explicar las divergencias en

cuanto a la magnitud de la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  registrada. Por ello, estos resultados se deben interpretar de manera independiente.

La señalización serotoninérgica desempeña un papel central en la fisiopatología y tratamiento de la depresión (Liu et al., 2019). En esta tesis, se ha encontrado que astrocitos de CPFm pueden responder con aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular a la señalización serotoninérgica, tanto a la liberación endógena de 5-HT promovida por las proyecciones del NDR, como a la aplicación local de 5-HT en rodajas de cerebro de ratón, confirmando estudios anteriores realizados en astrocitos en cultivo, o en rodajas de cerebro (Nilsson et al., 1991; Hagberg et al., 1998; Sandén et al., 2000; Schipke et al., 2011). Además, se confirmó que los receptores astrocitarios involucrados en esta respuesta, que ocurre de manera independiente a la generación de potenciales de acción por parte de las neuronas, son de la familia de receptores 5-HT<sub>2</sub> a través de la activación de la vía IP3. Los resultados de este trabajo indican la contribución de los 3 subtipos (5-HT<sub>2A,2B,2C</sub>) puesto que el bloqueo individual de cada uno de ellos no consiguió inhibir por completo la activación de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos. Se ha identificado que la vía de señalización preferente que se desencadena tras la estimulación con 5-HT involucra proteínas G $\alpha_q$  que promueven la activación de PLC y la vía IP3, lo que refuerza la hipótesis de la activación de los receptores 5-HT<sub>2</sub> en astrocitos. Sin embargo, la participación de otros receptores para 5-HT que puedan estar presentes en los astrocitos de CPFm, en las respuestas de  $\text{Ca}^{2+}$  no ha sido explorado en detalle, por lo que no se puede descartar totalmente su contribución.

La señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos se ha asociado con la liberación de gliotransmisores por parte de estas células (Bezzi y Volterra, 2001), que pueden inducir un impacto funcional y estructural sobre las sinapsis, los circuitos cerebrales y el comportamiento (Perea et al., 2014a; Yu et al., 2020). Entre estos gliotransmisores, distintas evidencias muestran como el glutamato puede modular la excitabilidad neuronal a través de la activación de receptores NMDA extrasinápticos presentes en la membrana neuronal generando SICs que contribuyen a despolarizar las neuronas (Araque et al., 1998; Parri et al., 2001; Perea y Araque 2005b; Panatier et al., 2006; Henneberger et al., 2010; Pankratov y Lalo 2015). Sin embargo, hasta ahora no existían evidencias de que 5-HT pudiera evocar dichas respuestas. Así, los resultados obtenidos en esta tesis muestran por primera vez que 5-HT puede evocar un aumento de la gliotransmisión, reflejada como un incremento en la frecuencia de SICs, en neuronas de CPFm en rodajas de cerebro de ratones control. Por tanto, 5-HT podría activar receptores 5-HT<sub>2</sub> en la membrana de astrocitos de CPFm, lo que desencadenaría la liberación de glutamato y la generación de SICs a través de la activación de receptores NMDA, como indica el bloqueo de las respuestas en presencia de ciproheptadina y D-AP5. Aunque estos experimentos se realizaron en presencia de TTX para reducir la contribución neuronal (Perea y Araque 2005b), los resultados obtenidos en los ratones *Ip3r2<sup>-/-</sup>*, que muestran una reducción en la frecuencia de SICs, resultaron decisivos para establecer la relación entre la activación de receptores 5-HT<sub>2</sub> en astrocitos, la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y el aumento de excitabilidad neuronal.

A pesar de la controversia existente en lo relativo a las teorías que tratan de explicar la patogénesis del TD (Moncrieff et al., 2022), diversos estudios muestran una conexión entre niveles bajos de 5-HT y TD (Ressler y Nemeroff, 2000; Sachs et al., 2015). En línea con estos hallazgos, se confirmó la existencia de una señalización serotoninérgica aberrante en ratones

Cort utilizando el sensor serotoninérgico iSeroSnFR, expresado en los astrocitos de la CPFm. De esta manera, se observaron niveles reducidos de 5-HT liberados por las proyecciones del NDR hacia la CPFm en ratones Cort. Este resultado puede ir en línea con la disminución en la amplitud de eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos y en la gliotransmisión después de la estimulación con 5-HT en la CPFm. Esta reducción en la actividad de los astrocitos de ratones Cort parece ir ligada a la señalización serotoninérgica, porque en ausencia de estimulación con 5-HT, los astrocitos de CPFm de ratones Cort presentan una hiperexcitabilidad en las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  y también un incremento en la frecuencia de SICs. Por tanto, estos resultados sugieren que las alteraciones en la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos inducidas por estados asociados al TD también tienen un impacto significativo en la señalización astrocito-neurona (Fullana et al., 2019a). De acuerdo con esto, diversos trabajos, han relatado una desregulación de la gliotransmisión ligada a enfermedades neuropsiquiátricas (Halassa et al., 2007a; Scofield et al., 2015; Habbas et al., 2015; Fullana et al., 2019a). El aumento en la gliotransmisión en ratones Cort es coherente con el estudio realizado por Fullana y colaboradores en el que muestran como la gliotransmisión se encuentra aumentada en un modelo de TD basado en la inhibición de los transportadores para glutamato en los astrocitos, (Fullana et al., 2019a), y con el estudio de Yu y colaboradores en el que observan un aumento de la gliotransmisión en ratones sometidos a estrés crónico por derrota social (Yu et al., 2022).

Los resultados observados en los ratones Cort, que ponen de manifiesto la presencia de una actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  y una gliotransmisión reducida en respuesta a 5-HT, llevaron a pensar si estas respuestas serían exclusivas del sistema serotoninérgico o si podría haber otros neurotransmisores implicados. En este contexto y tomando en consideración estudios previos como el de Cao y colaboradores (Cao et al., 2013), en el que la gliotransmisión purinérgica estaba alterada en un modelo de TD en ratón, se registró la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos en respuesta a ATP. Los resultados obtenidos mostraron una respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  alterada después de la estimulación con ATP, indicando que esta disfunción en la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos en un contexto de TD puede afectar a una amplia variedad de vías de señalización tanto entre neuronas y astrocitos, como entre células gliales. Es preciso resaltar que, aunque ambos neurotransmisores pudieran inducir una señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  alterada en los astrocitos, bajo condiciones asociadas al TD, la naturaleza de esta alteración difiere completamente. Así mientras la actividad serotoninérgica evoca una disminución de la magnitud de la respuesta en ratones Cort, la actividad purinérgica induce una respuesta exacerbada. Estas diferencias ponen de manifiesto que el TD no causa un déficit en la capacidad de los astrocitos para aumentar sus niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular; así como, la diversidad de respuestas de los astrocitos ante distintos estímulos.

El sistema serotoninérgico ejerce un gran impacto en la transmisión sináptica, regulando la actividad sináptica excitadora e inhibitora a través de la activación de diferentes subtipos de receptores para 5-HT expresados en distintos tipos celulares y localizados estratégicamente en distintas regiones del cerebro (Lesch y Waider 2012). Sin embargo, el papel que juegan los astrocitos en esta señalización no ha sido estudiado en detalle. En esta tesis se detalla cómo 5-HT inducía plasticidad sináptica en las neuronas principales de las capas 2/3 de CPFm, generando una depresión transitoria de las EPSCs, tal y cómo se había descrito previamente en

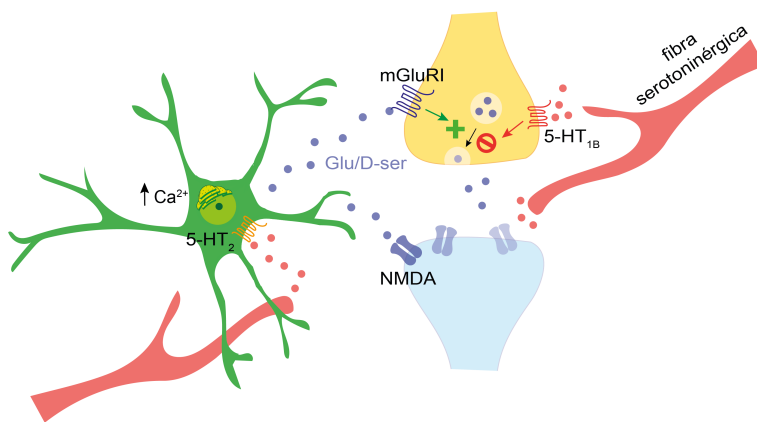


otros estudios (Zhong et al., 2008a; Tian et al., 2017). Esta plasticidad mediada por 5-HT requería por un lado la activación de los receptores 5-HT<sub>1B</sub>, que se localizan predominantemente en terminales axónicos que regulan la liberación de neurotransmisores (Kjaerby et al., 2016), y por otro la señalización dependiente de Ca<sup>2+</sup> en astrocitos. Esta participación astrocitaria se constató al observar que la reducción de la señalización de Ca<sup>2+</sup> en astrocitos mediante la carga intracelular de BAPTA o mediante el uso de ratones *Ip3r2*<sup>-/-</sup>, provocaba una depresión sostenida de las EPSCs tras la estimulación con 5-HT. Además, se observaron efectos similares al bloquear la familia de los receptores 5-HT<sub>2</sub>, que median la señalización de Ca<sup>2+</sup> inducida por 5-HT en los astrocitos. Es preciso mencionar que se ha estudiado la contribución de estos receptores para 5-HT por sus altos niveles de expresión en CPFm y su localización estratégica en los distintos tipos celulares (Verkhatsky et al., 2021). Sin embargo, no se puede descartar la contribución a la transmisión sináptica excitadora de otros subtipos de receptores para 5-HT, como el 5-HT<sub>1D</sub> neuronal (Bruinvels et al., 1994) o los 5-HT<sub>1A,1B,1D,1F,5A,6,7</sub> astrocitarios (Carson et al., 1996; Hirst et al 1998; Chaumont-Dubel et al., 2023).

La depresión de la transmisión sináptica excitadora parece estar inducida preferentemente por la activación de receptores 5-HT<sub>1B</sub> que pueden provocar una hiperpolarización de las membranas mediante la activación de canales Kir3.x (Araneda y Andrade 1991; Béïque et al., 2004) inhibiendo de esta manera la transmisión glutamatérgica. Los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, a pesar de activar la misma vía de señalización intracelular, no parecen estar participando en esta respuesta, ya que su bloqueo no modificaba la depresión transitoria de las EPSCs inducida por 5-HT. El hecho de que esta depresión de las EPSCs se mantenga a largo plazo, ante el bloqueo de los receptores de la familia 5-HT<sub>2</sub> parece indicar que su activación promueve una potenciación de las EPSCs. La existencia de una depresión transitoria en respuesta a la estimulación con 5-HT en presencia de un inhibidor de los receptores postsinápticos asociados a proteínas G, indicaba que la contribución de los receptores 5-HT<sub>2</sub> debía ser preferentemente presináptica. Se confirmó esta hipótesis mediante el uso del ratón transgénico *htr2a*<sup>-/-</sup> recuperando la expresión de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> exclusivamente en astrocitos. La presencia selectiva del receptor 5-HT<sub>2A</sub> en astrocitos de CPFm, induce una potenciación de las EPSCs evocada por el agonista específico de los receptores 5-HT<sub>2A</sub>, TCB-2, en un 70% de las neuronas registradas. Este dato, junto a la existencia de una potenciación de las EPSCs parcialmente inhibida (37,5% de potenciación) ante la estimulación con TCB-2 en ratones *Ip3r2*<sup>-/-</sup>, destaca la participación significativa de los astrocitos en esta respuesta, contribuyendo con los receptores 5-HT<sub>2A</sub> neuronales a la misma (Chen et al., 2003; Zhang y Stackman 2015). La elección del subtipo de receptores 5-HT<sub>2A</sub> con respecto a los subtipos 5HT<sub>2B,2C</sub> se debe a los elevados niveles de expresión de este receptor en dendritas apicales de neuronas piramidales de capa 5 de la CPF (Willins et al., 1997; Martín-Ruiz et al., 2001; de Almeida y Mengod 2007), a la vinculación preferente de los mismos con la regulación de estados emocionales (Guiard y Giovanni 2015) y a su desregulación en condiciones de TD (Pandey et al., 2002; Carhart-Harris y Nutt 2017; Underwood et al., 2018). En concreto la expresión de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> parece estar incrementada en astrocitos de pacientes que padecieron distintas patologías (Wu et al., 1999).

Diversos estudios han mostrado que la liberación de gliotransmisores como glutamato, D-serina o ATP puede potenciar la transmisión sináptica excitadora a través de la activación de

distintos receptores en las neuronas pre- y postsinápticas (Henneberger et al., 2010; Perea et al., 2016). En esta línea, los resultados obtenidos proponen la contribución de los receptores mGluR1 y NMDAR a la depresión transitoria de las EPSCs evocada por 5-HT. Así, la hipótesis que planteamos implicaría que el efecto neto de 5-HT sobre la transmisión sináptica excitadora estaría inducido por la activación de receptores 5-HT<sub>1B</sub> presinápticos y receptores 5-HT<sub>2</sub> en astrocitos, los cuales desencadenarían la liberación de gliotransmisores (glutamato o D-serina) y la activación de receptores mGluR1 y NMDA neuronales (Figura D1). De este modo, existiría una acción cooperativa de astrocitos y neuronas en las acciones sinápticas serotoninérgicas con consecuencias funcionales relevantes.



**Figura D1. Mecanismo de acción propuesto del efecto de la señalización serotoninérgica sobre la transmisión sináptica excitadora en CPFm.** 5-HT (círculos rojos) puede activar distintos subtipos de receptores serotoninérgicos localizados en diversos tipos celulares en CPFm. La hipótesis planteada en esta tesis doctoral contempla la activación mayoritaria de receptores 5-HT<sub>1B</sub> en los terminales presinápticos (amarillo), que inducen una inhibición de la transmisión glutamatérgica, y la activación de receptores de la familia 5-HT<sub>2</sub>

en astrocitos (verde), que desencadenan un aumento en la señalización de Ca<sup>2+</sup> y la liberación de gliotransmisores. Entre los distintos tipos de gliotransmisores, la liberación de glutamato y D-serina (círculos azules) puede activar receptores mGluR1 y NMDA que inducen una potenciación de las EPSCs. Este efecto excitatorio compensaría el efecto inhibitorio inicial, dando lugar a una depresión transitoria de las EPSCs como resultado neto de la acción de 5-HT.

No obstante, es preciso resaltar que los resultados presentados en esta tesis reflejan el efecto de 5-HT y su modulación a través de la comunicación astrocito-neurona, sobre la transmisión sináptica excitadora, dejando al margen la contribución de la actividad inhibitoria. Futuros experimentos tendrán que considerar el papel de los astrocitos sobre la transmisión sináptica inhibitoria evocada por 5-HT, así como la posible modulación realizada por estas células sobre el balance excitación/inhibición.

El TD se ha relacionado con una disfunción en la comunicación astrocito-neurona (Cao et al., 2013; Fullana et al., 2019a) y una alteración de la transmisión sináptica excitadora y la plasticidad sináptica (Duman et al., 2016; Fullana et al., 2019a; Wang et al., 2023). Considerando que los resultados obtenidos en esta tesis muestran una disfunción tanto en la señalización de Ca<sup>2+</sup> astrocitaria como en la gliotransmisión evocada por 5-HT en la CPFm de ratones Cort, se estudió el efecto que esto podría tener sobre la transmisión sináptica estimulada por 5-HT. De manera sorprendente, observamos que 5-HT inducía una depresión persistente de las EPSCs, similar a la obtenida ante una señalización reducida de Ca<sup>2+</sup> en astrocitos (BAPTA intracelular e *Ip3r2*<sup>-/-</sup>), el bloqueo de los receptores 5-HT<sub>2</sub>, mGluR1 y NMDA. Por tanto, esto permitía

hipotetizar que existe una conexión entre la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos y los distintos receptores implicados. Los resultados muestran que hay una reducción en la magnitud de la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos en respuesta a la estimulación con 5-HT. A pesar de la controversia (Aguilhon et al., 2008; Fiacco et al., 2009), diversas evidencias muestran como un aumento en la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos es capaz de inducir la liberación de gliotransmisores (Bezzi y Volterra 2001; Santello et al., 2012; Yoon y Lee 2014). En concreto, en las últimas décadas distintas evidencias sugieren que la modulación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en astrocitos inducida por neuromoduladores induce la liberación de gliotransmisores (Pacholko et al., 2020; Goenaga et al., 2023). Como se mostró con anterioridad, los astrocitos expresan receptores 5-HT<sub>2</sub>, cuya activación puede inducir un aumento en la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en el astrocito. Sin embargo, en los ratones Cort la magnitud del aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  está reducida, aunque la frecuencia de eventos no se ve modificada. Esta actividad deficiente podría estar relacionada con una expresión o un funcionamiento alterado de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> en astrocitos, como se ha visto en relación con distintos estados patológicos (Wu et al., 1999).

Por otro lado, teniendo en cuenta la complejidad de la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitario, estos resultados plantean el siguiente interrogante ¿la magnitud de la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  en el astrocito está relacionada con una disminución en la probabilidad de liberación de gliotransmisores? Diversos estudios sugieren que un aumento en la magnitud de los eventos de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos, resultado de la sincronización de numerosos microdominios autónomos, induciría una respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  coordinada que podría modular la probabilidad de liberación de gliotransmisores (Panatier et al., 2011; Di Castro et al., 2011; Volterra et al., 2014). Queda por resolver si en condiciones patológicas asociadas al TD existe una alteración en alguno de los niveles de regulación de la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos inducida por 5-HT, ya sea una alteración en la sincronización de los eventos, o a nivel de integración de las señales de los distintos microdominios o en la eficiencia de los receptores metabotrópicos 5-HT<sub>2A</sub> para inducir gliotransmisión. En definitiva, en los ratones Cort, la deficiencia en la gliotransmisión inducida por 5-HT, podría reflejar una menor activación de receptores neuronales mGluR1 y NMDA, resultando en un desbalance en la modulación de la señalización serotoninérgica en CPFm (Figura R25). Esta disminución de la contribución astrocitaria podría suponer la no compensación del efecto inducido por los receptores 5-HT<sub>1B</sub> neuronales, resultando en una depresión mantenida. No obstante, no se puede descartar la participación de otros receptores expresados en distintos tipos celulares (neuronas piramidales, interneuronas GABAérgicas, astrocitos, otras células gliales) en el mecanismo que subyace a la plasticidad sináptica aberrante evocada por 5-HT en ratones Cort. En este contexto, diversos estudios exponen otras alteraciones en la comunicación astrocito-neurona asociados al TD, entre ellos destaca la alteración en la expresión de los receptores GLT-1 (Choudary et al., 2005), cuyo bloqueo puede inducir un fenotipo depresivo en roedores (Fullana et al., 2019b), afectando la señalización glutamatérgica.

Diversos estudios han demostrado que los astrocitos, mediante cambios en la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitario y en la gliotransmisión están involucrados en comportamientos complejos, que requieren de la activación de la CPFm entre otras regiones, como son, la toma de decisiones (Mederos et al., 2021) y la memoria de trabajo (Gordleeva et al., 2021). Considerando los

resultados obtenidos que muestran una disfunción de la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos y de la plasticidad sináptica evocada por 5-HT en la CPFm de ratones Cort, se evaluó el efecto de la activación selectiva de los astrocitos en esta región, mediante la utilización de Gq-DREADDS, sobre el estado de ánimo y las habilidades cognitivas de los animales. Se ha descrito que el aumento de la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos mediante Gq-DREADDS en la CPFm, afecta a la conectividad intracortical y también a las proyecciones emitidas desde esta área a regiones subcorticales del cerebro (Shah et al., 2022), incluyendo al hipocampo y a la amígdala, áreas cerebrales clave involucradas en tareas espaciales y de memoria, y en comportamientos relacionados con la ansiedad, respectivamente. Por ello, se enfocó el estudio en el papel de la señalización astrocitaria sobre comportamientos que involucran el estado de ánimo, la exploración espacial, la preferencia por la novedad y la interacción social, y que se han visto alterados en la condición patológica del TD (Uekermann et al., 2008; Beblo et al., 2011; Benke et al., 2021).

El estudio del efecto de la manipulación selectiva de la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos de ratones Cort mediante Gq-DREADDS reportó hallazgos que resultaron de gran interés. Observamos que la activación del  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitario en ratones Cort macho reducía el fenotipo depresivo. De manera que los resultados obtenidos en las distintas pruebas comportamentales fueron comparables a los obtenidos en ratones control. Por tanto, se muestra por primera vez la restauración de las capacidades cognitivas en ratones Cort mediante la modulación del  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitario en la CPFm. Estos resultados están en línea con otros estudios en los que la disminución de la señalización astrocitaria presente en los ratones *Ip3r2*<sup>-/-</sup> se ha relacionado con comportamientos depresivos en estos ratones (Cao et al., 2013; Liu et al., 2022).

Teniendo en cuenta el alto riesgo y prevalencia del TD en hembras (McLean et al., 2011; Williams et al., 2022), se estudió el efecto de la activación de astrocitos con Gq-DREADDS en ratones Cort hembra. Observamos que esta estrategia también inducía una recuperación de las habilidades cognitivas y sociales. Sin embargo, las hembras a diferencia de los machos no mostraron cambios en los niveles de desesperanza y ansiedad. Con respecto a este resultado, es preciso comentar que las hembras Cort, sin Gq-DREADDS, no presentaron mayores valores de inmovilidad en el test de natación forzada con respecto a las hembras control. Esto podría estar relacionado con niveles más elevados de Cort en hembras que en machos al finalizar el tratamiento, como ha sido sugerido por Bertholomey y colaboradores (Bertholomey et al., 2022). Otra hipótesis se basa en la edad a la se empieza el tratamiento con Cort. Un estudio en el que el tratamiento con Cort se inicia en ratones adultos (p98), en lugar de juveniles (p30) como en la presente tesis doctoral, sí describen un aumento de la desesperanza en los ratones hembra tratados con respecto a los controles (Berger et al., 2019).

Contemplando el posible efecto terapéutico que la activación de los astrocitos de CPFm parece tener en el TD, se estudiaron los mecanismos que podrían subyacer a los resultados obtenidos en las pruebas comportamentales. En primer lugar, se valoraron las consecuencias que podía tener la activación selectiva de la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre su capacidad de gliotransmisión y sobre la transmisión sináptica excitadora. Así tanto en ratones control como en ratones Cort, la activación de receptores Gq-DREADDS desencadena un aumento de la frecuencia de SICs, siendo

mayor en ratones Cort. Estos datos apoyan la capacidad de los astrocitos de liberar glutamato y D-serina que aumentan la excitabilidad neuronal. Además, el aumento de frecuencia de estas corrientes en ratones Cort, pone de manifiesto que al contrario de lo observado con 5-HT, el tratamiento con Cort no producía déficits en la capacidad de gliotransmisión inducida por DREADDS. Por tanto, la repercusión de la activación de receptores Gq-DREADDS o receptores serotoninérgicos en astrocitos podría ser distinta para la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos, y como consecuencia modular de distinta manera la liberación de gliotransmisores.

En cuanto a los efectos sobre la plasticidad sináptica, la activación de Gq-DREADDS en astrocitos provocó una potenciación de las EPSCs de larga duración y magnitudes similares en ratones Cort y control que estaba ausente tras el bloqueo de receptores mGluR1. Estos resultados apoyan que el mecanismo subyacente a este efecto podría ser similar al observado tras la estimulación de 5-HT. Considerando la hipótesis en la que la activación de Gq-DREADDS facilitaría la transmisión glutamatérgica a través de la activación de receptores mGluR1, se estudió el efecto combinado de la activación selectiva del  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos de CPFm y el bloqueo sistémico de los receptores mGluR1. En línea con los datos obtenidos *ex vivo*, el bloqueo selectivo de mGluR1 con inyecciones de AIDA eliminó los efectos beneficiosos de Gq-DREADDS sobre el rendimiento conductual de los ratones Cort, respaldando con ello el papel de mGluR1 en las funciones cognitivas (Sun y Neugebauer 2011; Mederos et al., 2021), y sugiriendo que la señalización glutamatérgica procedente de astrocitos podía inspirar los efectos observados (Figura R35).

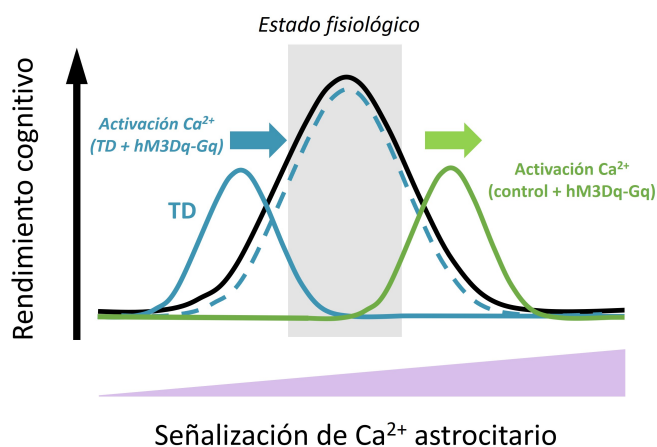
La utilización de Gq-DREADDS en astrocitos se ha mostrado como una buena herramienta para activar la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  (Chai et al., 2017; Durkee et al., 2019). Sin embargo, hay que considerar que el ligando utilizado para su activación, CNO se degrada en clozapina, un potente medicamento antipsicótico, que puede potencialmente inducir efectos secundarios (Gomez et al., 2017). Por lo tanto, se realizaron experimentos en los que se expresaron los vectores virales GFAP-mCherry en ratones control y se les administró i.p. CNO. Como resultado, estos ratones no mostraron cambios conductuales significativos en las pruebas analizadas (Figura R30), sugiriendo que los efectos conductuales obtenidos con CNO se podían atribuir a la estimulación selectiva de los astrocitos que expresan Gq-DREADDS y no a la modulación directa de los receptores para DA o 5-HT (Gomez et al., 2017). Aunque, no se puede descartar que la clozapina también pueda unirse a diferentes dianas moleculares que no se consideran en este estudio (Ozawa y Arakawa 2021).

Teniendo en cuenta el efecto beneficioso de Gq-DREADDS en astrocitos de CPFm sobre el rendimiento conductual de los ratones Cort, se estudió el efecto de esta manipulación selectiva sobre ratones control. Sorprendentemente, esta estrategia provocó un efecto perjudicial para el comportamiento del animal, registrándose valores similares a los obtenidos para los ratones Cort. En consonancia con las alteraciones de la conectividad funcional en redes prefrontales inducidas por CNO en sujetos sanos (Shah et al., 2022), los datos de este trabajo muestran que un aumento de la señalización astrocitaria de  $\text{Ca}^{2+}$  en la CPFm altera la actividad neuronal, lo que

lleva a un rendimiento perjudicial en tareas cognitivas y relacionadas con el estado de ánimo.

En el hipocampo, la activación de astrocitos a través de Gq-DREADDS mejora las habilidades de memoria al aumentar la transmisión sináptica excitadora (Adamsky et al., 2018) lo que sugiere que la señalización de los astrocitos tendría un papel beneficioso en la tarea de memoria contextual dependiente del hipocampo (Adamsky et al., 2018). En contraste con esto, los datos aquí recogidos muestran que la activación de astrocitos de CPFm, a pesar de promover una potenciación de la transmisión sináptica excitatoria (Figura R34), no logra inducir efectos beneficiosos en ratones control. En línea con estos resultados, experimentos realizados en animales control han demostrado que los Gq-DREADDS en astrocitos de la corteza visual conducen a alteraciones significativas en las transiciones sueño-vigilia, disminuyendo el tiempo que los animales permanecen despiertos (Vaidyanathan et al., 2021), y la activación selectiva de astrocitos en la corteza cingulada desencadena hiperactividad neuronal y aumenta la conectividad funcional *BOLD* (del inglés *Blood Oxygen-Level-Dependent*) entre regiones corticales e hipocampales, similar a la actividad anormal encontrada en la enfermedad de Alzheimer (Shah et al., 2022). Por lo tanto, estos hallazgos ponen de manifiesto la diversidad de los circuitos astrocito-neurona y proponen que se deben considerar las diferencias regionales para la interpretación de los resultados conductuales al utilizar Gq-DREADDS en astrocitos.

En resumen, estos resultados reflejan la estrecha relación entre la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos y el rendimiento cognitivo (Figura D2). Asimismo, los datos obtenidos en esta tesis doctoral plantean como hipótesis la existencia de un rango óptimo en la señalización por astrocitos, y que fuera del mismo, tanto por un exceso como por una reducción de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  fisiológicos se producirían alteraciones cognitivas.



**Figura D2. Hipótesis de la relación entre la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitario y el rendimiento cognitivo.** Gráfico mostrando la relación entre la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos de CPFm y la correcta ejecución de las tareas cognitivas. En condiciones fisiológicas (barra gris) existe un rango óptimo entre las dinámicas de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos y el rendimiento cognitivo (línea negra). Sin embargo, en condiciones patológicas, como el TD, este equilibrio está alterado (línea azul), existiendo una señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitario deficiente y un deterioro cognitivo. En este caso, la activación de la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos de CPFm con el fin de restaurar las dinámicas fisiológicas restablece las funciones cognitivas (línea azul discontinua). En cambio, esta misma estrategia en condiciones fisiológicas, en las que existen valores óptimos de señalización del  $\text{Ca}^{2+}$  astrocitario, resulta

perjudicial para el rendimiento cognitivo. En definitiva, estos resultados indican que existe una estrecha relación entre las dinámicas de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos de CPFm y el comportamiento animal.

Por otro lado, se ha descrito que la disfunción glutamatérgica y los receptores NMDA juegan un papel crítico en los trastornos psiquiátricos, incluido el TD (Li et al., 2019). Por lo tanto, el bloqueo del receptor NMDA con ketamina (Berman et al., 2000) resulta en efectos antidepresivos más rápidos en comparación con los antidepresivos clásicos, incluidos los inhibidores selectivos de la recaptación de 5-HT, cuyos efectos pueden tardar varias semanas en los pacientes con TD. En los resultados obtenidos en esta tesis, se muestra que el aumento de la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos de CPFm puede inducir efectos antidepresivos en ratones Cort, por lo que se podría considerar como una diana potencial para el desarrollo de fármacos antidepresivos. Sin embargo, como ocurre con la utilización de ketamina (Nugent et al., 2018), la sobreactivación de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos de CPFm en ratones control resulta en un aumento significativo de los síntomas depresivos. Por lo tanto, estimular la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos de CPFm es beneficioso en condiciones patológicas, pero no produce efectos favorables en sujetos sanos. Estos hallazgos necesitarán una exploración adicional para llegar a comprender los mecanismos subyacentes a las redes corticales disfuncionales asociadas a la señalización de astrocitos con Gq-DREADDS y al comportamiento animal en condiciones fisiológicas. Además, los experimentos realizados en esta tesis se centran en la respuesta aguda a la activación de astrocitos, por lo que serán necesarios estudios longitudinales para investigar si los efectos beneficiosos reportados en ratones Cort, tras la estimulación con CNO, son duraderos y, por tanto, tienen mayor valor terapéutico.

De manera global, los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral revelan el papel crítico de los astrocitos y el control preciso de sus niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  para la regulación de las funciones ejecutivas impulsadas por la CPFm.







# - CAPÍTULO VI - CONCLUSIONES

---



## VI. Conclusiones

Considerando los resultados obtenidos, los análisis descritos en el capítulo IV y la interpretación expuesta en el capítulo V, se concluye que:

1. El tratamiento crónico con Cort aumenta la complejidad anatómica de los astrocitos de las capas 2/3 de CPFm.
2. Las dinámicas de  $\text{Ca}^{2+}$  de astrocitos de CPFm a nivel individual, así como la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  a nivel poblacional están alteradas en los ratones Cort.
3. Durante la interacción social los ratones Cort presentan dinámicas de  $\text{Ca}^{2+}$  reducidas en astrocitos de CPFm.
4. Los astrocitos de CPFm son sensibles a la señalización serotoninérgica, pudiendo responder con aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular a la liberación endógena de 5-HT estimulada por las aferencias procedentes del NDR.
5. La señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos inducida por 5-HT requiere la activación de la familia de receptores  $5\text{-HT}_2$  y de la vía  $\text{IP}_3$  en las capas 2/3 de rodajas de CPFm.
6. El tratamiento crónico con Cort induce una reducción en la liberación de 5-HT por parte de las neuronas del NDR que proyectan a CPFm.
7. El tratamiento crónico con Cort produce una disfunción de la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por 5-HT en astrocitos de las capas 2/3 de rodajas de CPFm.
8. La estimulación serotoninérgica de astrocitos promueve la gliotransmisión, a través de la liberación de glutamato y/o D-serina, desencadenando la generación de SICs por activación de receptores NMDA en neuronas de la capa 2/3 de rodajas de CPFm.
9. El tratamiento crónico con Cort promueve una gliotransmisión deficiente en respuesta a 5-HT.
10. La plasticidad sináptica excitadora en capas 2/3 de CPFm evocada por 5-HT involucra la señalización astrocitaria, que se ve alterada en ratones Cort provocando una inhibición a largo plazo de la transmisión sináptica excitadora.
11. El efecto neto de 5-HT sobre la transmisión sináptica excitadora resulta de la acción cooperativa de los receptores neuronales  $5\text{-HT}_{1B}$ , mGluR1, NMDA y los receptores astrocitarios  $5\text{-HT}_2$ .

12. La activación selectiva de los astrocitos de CPFm con Gq-DREADDS desencadena un aumento de la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos y la gliotransmisión, así como una potenciación de la transmisión sináptica excitadora a través de la activación de receptores mGluR1.
13. La estimulación selectiva de los astrocitos de CPFm con Gq-DREADDS revierte las alteraciones cognitivas de ratones Cort, mejorando las habilidades cognitivas y sociales.
14. La estimulación selectiva de los astrocitos de CPFm con Gq-DREADDS en ratones control tiene un impacto negativo en el rendimiento cognitivo, recapitulando los principales déficits asociados al TD.
15. Los astrocitos participan en la actividad de los circuitos cerebrales que subyacen al rendimiento conductual de los animales.
16. El control de la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en astrocitos de CPFm se propone como una potencial herramienta terapéutica en el tratamiento del TD.

## VI. *Conclusions*

Considering the obtained results, the analysis described in chapter IV, and according to the interpretation presented in chapter V, it can be concluded that:

1. Chronic corticosterone treatment increases the anatomical complexity of astrocytes in layers 2/3 of mPFC.
2. mPFC astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics both at the individual level and at the population level are altered in Cort mice.
3. During social interaction, Cort mice exhibit reduced  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics in mPFC astrocytes.
4. mPFC astrocytes are sensitive to serotonergic signaling responding with intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  increases to the endogenous 5-HT released by DRN projections.
5. 5-HT-evoked  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in astrocytes from layer 2/3 of mPFC slices requires the 5-HT<sub>2</sub> receptor family and IP3 pathway activation.
6. Chronic corticosterone treatment induces a reduction in 5-HT release from DRN neurons and their projections to mPFC.
7. Chronic corticosterone treatment induces a dysfunctional 5-HT-evoked  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in astrocytes of layer 2/3 in mPFC slices.
8. Serotonergic stimulation of astrocytes promotes gliotransmission, by releasing glutamate and/or D-serine, which triggers SICs through the activation of NMDA receptors in layer 2/3 neurons from mPFC slices.
9. Chronic corticosterone treatment promotes impaired 5-HT-mediated gliotransmission.
10. Excitatory synaptic plasticity evoked by 5-HT in layer 2/3 of mPFC requires astrocyte signalling and it is altered in Cort mice, leading to a long-term inhibition of excitatory synaptic transmission.
11. Cooperative actions of neuronal 5-HT<sub>1B</sub>, mGluR1, NMDA and astrocytic 5-HT<sub>2</sub> receptors account for the net effect of 5-HT on the excitatory synaptic transmission.

12. Selective activation of mPFC astrocytes with Gq-DREADDS stimulates astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  activity and gliotransmission, as well as it potentiates excitatory synaptic transmission through activation of mGluR1 receptors.
13. Selective stimulation of mPFC astrocytes with Gq-DREADDS reverses cognitive impairments shown by Cort mice, restoring cognitive and social skills.
14. Selective stimulation of mPFC astrocytes with Gq-DREADDS in control mice has a negative impact on cognitive performance, recapitulating the main deficits associated with MDD.
15. Astrocytes contributes to brain circuits activity underlying animals' behavior.
16. Targeting  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in mPFC astrocytes is proposed as a potential therapeutic approach for MDD treatment.



# Bibliografía

- Abbas AI, Sundiang MJM, Henoch B, et al (2018) Somatostatin Interneurons Facilitate Hippocampal-Prefrontal Synchrony and Prefrontal Spatial Encoding. *Neuron* 100:926-939.e3.
- Adamsky A, Kol A, Kreisel T, et al (2018) Astrocytic Activation Generates De Novo Neuronal Potentiation and Memory Enhancement. *Cell* 174:59-71.e14.
- Agarwal A, Wu PH, Hughes EG, et al (2017) Transient Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore Induces Microdomain Calcium Transients in Astrocyte Processes. *Neuron* 93:587-605.e7.
- Aghajanian GK, Marek GJ (1997) Serotonin Induces Excitatory Postsynaptic Potentials in Apical Dendrites of Neocortical Pyramidal Cells. *Neuropharmacology* 36:589-599.
- Aguado F, Espinosa-Parrilla JF, Carmona MA, Soriano E (2002) Neuronal Activity Regulates Correlated Network Properties of Spontaneous Calcium Transients in Astrocytes In Situ. *J Neurosci* 22:9430-9444.
- Agulhon C, Petravic J, McMullen AB, et al (2008) What Is the Role of Astrocyte Calcium in Neurophysiology? *Neuron* 59:932-946.
- Allen NJ (2019) Star Power: Astrocytes Regulate Behavior. *Cell* 177:1091-1093.
- Allen NJ, Eroglu C (2017) Cell Biology of Astrocyte-Synapse Interactions. *Neuron* 96:697-708.
- Amargós-Bosch M, Bortolozzi A, Puig MV, et al (2004) Co-expression and In Vivo Interaction of Serotonin1A and Serotonin2A Receptors in Pyramidal Neurons of Prefrontal Cortex. *Cerebral Cortex* 14:281-299.
- Anastasiades PG, Carter AG (2021) Circuit organization of the rodent medial prefrontal cortex. *Trends Neurosci* 44:550-563.
- Anderson CM, Bergher JP, Swanson RA (2004) ATP-induced ATP release from astrocytes. *J Neurochem* 88:246-256.
- Anderzhanova E, Kirmeier T, Wotjak CT (2017) Animal models in psychiatric research: The RDoC system as a new framework for endophenotype-oriented translational neuroscience. *Neurobiol Stress* 7:47-56.
- Andrade R, Malenka RC, Nicoll RA (1986) A G Protein Couples Serotonin and GABA<sub>B</sub> Receptors to the Same Channels in Hippocampus. *Science* 234:1261-1265.
- Angulo MC, Kozlov AS, Chrapak S, Audinat E (2004) Glutamate Released from Glial Cells Synchronizes Neuronal Activity in the Hippocampus. *J Neurosci* 24:6920-6927.
- Aomine Y, Oyama Y, Sakurai K, et al (2024) Clozapine N-oxide, compound 21, and JHU37160 do not influence effortful reward-seeking behavior in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 241:89-96.
- 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* 40:399-412.
- Araque A, Carmignoto G, Haydon PG (2001) Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu Rev Physiol* 63:795-813.
- Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, et al (2014) Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron* 81:728-739.

- Araque A, Li N, Doyle RT, Haydon PG (2000) SNARE Protein-Dependent Glutamate Release from Astrocytes. *J Neurosci* 20:666–673.
- Araque A, Martín ED, Perea G, et al (2002) Synaptically Released Acetylcholine Evokes Ca<sup>2+</sup> Elevations in Astrocytes in Hippocampal Slices. *J Neurosci* 22:2443–2450.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1998) Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 10:2129–2142.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 22:208–215.
- Armbruster BN, Li X, Pausch MH, et al (2007) Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potentially activated by an inert ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:5163–5168.
- Arora P, Sagar R, Mehta M, et al (2019) Serum S100B levels in patients with depression. *Indian J Psychiatry* 61:70–76.
- Artigas F (2015) Developments in the field of antidepressants, where do we go now? *Eur Neuropsychopharmacol* 25:657–670.
- Artigas F (2013) Serotonin receptors involved in antidepressant effects. *Pharmacol Ther* 137:119–131.
- Åsberg M, Träskman L, Thorén P (1976) 5-HIAA in the Cerebrospinal Fluid: A Biochemical Suicide Predictor? *Arch Gen Psychiatry* 33:1193–1197.
- Auer DP, Pütz B, Kraft E, et al (2000) Reduced glutamate in the anterior cingulate cortex in depression: An in vivo proton magnetic resonance spectroscopy study. *Biol Psychiatry* 47:305–313.
- Avesar D, Gullledge AT (2012) Selective serotonergic excitation of callosal projection neurons. *Front Neural Circuits* 6:12.
- Bailey KR, Crawley JN (2009) Anxiety-Related Behaviors in Mice. In: *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. CRC Press/Taylor & Francis, pp 77–101.
- Baldwin KT, Eroglu C (2017) Molecular mechanisms of astrocyte-induced synaptogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 45:113–120.
- Banasr M, Duman RS (2008) Glial Loss in the Prefrontal Cortex Is Sufficient to Induce Depressive-like Behaviors. *Biol Psychiatry* 64:863–870.
- Barker GRI, Warburton EC (2015) Object-in-place associative recognition memory depends on glutamate receptor neurotransmission within two defined hippocampal-cortical circuits: a critical role for AMPA and NMDA receptors in the hippocampus, perirhinal, and prefrontal cortices. *Cereb Cortex* 25:472–481.
- Bazargani N, Attwell D (2016) Astrocyte calcium signaling: the third wave. *Nat Neurosci* 19:182–189.
- Beblo T, Sinnamon G, Baune BT (2011) Specifying the Neuropsychology of Affective Disorders: Clinical, Demographic and Neurobiological Factors. *Neuropsychol Rev* 21:337–359.
- Beck A, Nieden R Zur, Schneider HP, Deitmer JW (2004) Calcium release from intracellular stores in rodent astrocytes and neurons in situ. *Cell Calcium* 35:47–58.
- Béique JC, Campbell B, Perring P, et al (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. *J Neurosci* 24:4807–4817.
- Béique JC, Imad M, Mladenovic L, et al (2007) Mechanism of the 5-hydroxytryptamine 2A receptor-mediated facilitation of synaptic activity in prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:9870–9875.

- Bellot-Saez A, Cohen G, van Schaik A, et al (2018) Astrocytic modulation of cortical oscillations. *Sci Rep* 8:11565.
- Bender CL, Calfa GD, Molina VA (2016) Astrocyte plasticity induced by emotional stress: A new partner in psychiatric physiopathology? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 65:68–77.
- Benke T, Marksteiner J, Ruepp B, et al (2021) Decision making under risk in patients suffering from schizophrenia or depression. *Brain Sci* 11:1178.
- Berger M, Gray JA, Roth BL (2009) The Expanded Biology of Serotonin. *Annu Rev Med* 60:355–366.
- Berger S, Gureczny S, Reisinger SN, et al (2019) Effect of Chronic Corticosterone Treatment on Depression-Like Behavior and Sociability in Female and Male C57BL/6N Mice. *Cells* 8:1018.
- Bergersen LH, Morland C, Ormel L, et al (2012) Immunogold Detection of L-glutamate and D-serine in Small Synaptic-Like Microvesicles in Adult Hippocampal Astrocytes. *Cereb Cortex* 22:1690–1697.
- Berman RM, Cappiello A, Anand A, et al (2000) Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry* 47:351–354.
- Berridge MJ (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361:315–325.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:517–529.
- Bertholomey ML, Nagarajan V, Smith DM, Torregrossa MM (2022) Sex- and age-dependent effects of chronic corticosterone exposure on depressive-like, anxiety-like, and fear-related behavior: Role of amygdala glutamate receptors in the rat. *Front Behav Neurosci* 16:950000.
- Berumen LC, Rodríguez A, Miledi R, García-Alcocer G (2012) Serotonin Receptors in Hippocampus. *The Scientific World Journal* 2012:823493.
- Bezzi P, Gundersen V, Galbete JL, et al (2004) Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci* 7:613–620.
- Bezzi P, Volterra A (2001) A neuron–glia signalling network in the active brain. *Curr Opin Neurobiol* 11:387–394.
- Bindocci E, Savtchouk I, Liaudet N, et al (2017) Three-dimensional Ca<sup>2+</sup> imaging advances understanding of astrocyte biology. *Science* 356: eaai8185.
- Bittar TP, Labonté B (2021) Functional Contribution of the Medial Prefrontal Circuitry in Major Depressive Disorder and Stress-Induced Depressive-Like Behaviors. *Front Behav Neurosci* 15:699592.
- Blanco-Suarez E, Liu TF, Kopelevich A, Allen NJ (2018) Astrocyte-Secreted Chordin-like 1 Drives Synapse Maturation and Limits Plasticity by Increasing Synaptic GluA2 AMPA Receptors. *Neuron* 100:1116–1132.e13.
- Bloodgood DW, Sugam JA, Holmes A, Kash TL (2018) Fear extinction requires infralimbic cortex projections to the basolateral amygdala. *Transl Psychiatry* 8:60.
- Bogdanova OV, Kanekar S, D’Anci KE, Renshaw PF (2013) Factors influencing behavior in the forced swim test. *Physiol Behav* 118:227–239.
- Boitier E, Rea R, Duchen MR (1999) Mitochondria Exert a Negative Feedback on the Propagation of Intracellular Ca<sup>2+</sup> Waves in Rat Cortical Astrocytes. *J Cell Biol* 145:795–808.
- Bojarskaite L, Bjørnstad DM, Pettersen KH, et al (2020) Astrocytic Ca<sup>2+</sup> signaling is reduced during sleep and is involved in the regulation of slow wave sleep. *Nat Commun* 11:3240.

- Bonansco C, Couve A, Perea G, et al (2011) Glutamate released spontaneously from astrocytes sets the threshold for synaptic plasticity. *Eur J Neurosci* 33:1483–1492.
- Bouwmeester H, Smits K, Van Ree JM (2002) Neonatal development of projections to the basolateral amygdala from prefrontal and thalamic structures in rat. *J Comp Neurol* 450:241–255.
- Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, et al (2005) Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci* 8:1263–1268.
- Boyko M, Kutz R, Grinshpun J, et al (2019) The effect of depressive-like behavior and antidepressant therapy on social behavior and hierarchy in rats. *Behav Brain Res* 370:111953.
- Boyman L, Williams GSB, Khananshvil D, et al (2013) NCLX: The mitochondrial sodium calcium exchanger. *J Mol Cell Cardiol* 59:205–213.
- Brancaccio M, Edwards MD, Patton AP, et al (2019) Cell-autonomous clock of astrocytes drives circadian behavior in mammals. *Science* 363:187–192.
- Brown SP, Hestrin S (2009) Intracortical circuits of pyramidal neurons reflect their long-range axonal targets. *Nature* 457:1133–1136.
- Bruinvels AT, Landwehrmeyer B, Gustafson EL, et al (1994) Localization of 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub> $\alpha$ , 5-HT<sub>1E</sub> and 5-HT<sub>1F</sub> receptor messenger RNA in rodent and primate brain. *Neuropharmacology* 33:367–386.
- Brumback AC, Ellwood IT, Kjaerby C, et al (2018) Identifying specific prefrontal neurons that contribute to autism-associated abnormalities in physiology and social behavior. *Mol Psychiatry* 23:2078–2089.
- Burgos-Robles A, Kimchi EY, Izadmehr EM, et al (2017) Amygdala inputs to prefrontal cortex guide behavior amid conflicting cues of reward and punishment. *Nat Neurosci* 20:824–835.
- Cai X, Gu Z, Zhong P, et al (2002) Serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptors regulate AMPA receptor channels through inhibiting Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II in prefrontal cortical pyramidal neurons. *J Biol Chem* 277:36553–36562.
- Camilleri M (2009) Serotonin in the gastrointestinal tract. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 16:53–59.
- Cannon W (1929) Bodily changes in pain, hunger, fear, and rage. D Appleton & Company, New York.
- Cao X, Li LP, Wang Q, et al (2013) Astrocyte-derived ATP modulates depressive-like behaviors. *Nat Med* 2013 19:773–777.
- Carhart-Harris RL, Nutt DJ (2017) Serotonin and brain function: A tale of two receptors. *J Psychopharmacol* 31:1091–1120.
- Carney RM, Freedland KE, Veith RC (2005) Depression, the autonomic nervous system, and coronary heart disease. *Psychosom Med* 67.
- Carson M, Thomas E, Danielson P, Sutcliffe J (1996) The 5-HT<sub>5A</sub> serotonin receptor is expressed predominantly by astrocytes in which it inhibits cAMP accumulation: A mechanism for neuronal suppression of reactive astrocytes. *Glia* 17:317–26.
- Carter M, Shieh J (2015) Animal Behavior. In: *Guide to Research Techniques in Neuroscience*. Academic Press, pp 39–71.
- Casey BJ, Jones RM (2010) Neurobiology of the Adolescent Brain and Behavior: Implications for Substance Use Disorders. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 49:1189–1201.
- Celada P, Victoria Puig M, Artigas F (2013) Serotonin modulation of cortical neurons and networks. *Front Integr Neurosci* 7:25.

- Chai H, Diaz-Castro B, Shigetomi E, et al (2017) Neural Circuit-Specialized Astrocytes: Transcriptomic, Proteomic, Morphological, and Functional Evidence. *Neuron* 95:531-549.e9.
- Chandler DJ, Lamperski CS, Waterhouse BD (2013) Identification and distribution of projections from monoaminergic and cholinergic nuclei to functionally differentiated subregions of prefrontal cortex. *Brain Res* 1522:38–58.
- Charles AC, Merrill JE, Dirksen ER, Sandersont MJ (1991) Intercellular signaling in glial cells: Calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron* 6:983–992.
- Charnay Y, Leger L (2010) Brain serotonergic circuitries. *Dialogues Clin Neurosci* 12:471.
- Chaumont-Dubel S, Galant S, Prieur M, et al (2023) Impact of 5-HT<sub>6</sub> Receptor Subcellular Localization on Its Signaling and Its Pathophysiological Roles. *Cells* 12:426.
- Chen A, Hough CJ, Li H (2003) Serotonin type II receptor activation facilitates synaptic plasticity via n-methyl-D-aspartate-mediated mechanism in the rat basolateral amygdala. *Neuroscience* 119:53–63.
- Chen N, Sugihara H, Kim J, et al (2016) Direct modulation of GFAP-expressing glia in the arcuate nucleus bi-directionally regulates feeding. *Elife* 5:e18716.
- Chien Y-F, Lin J-Y, Yeh P-T, et al (2021) Dual GRIN lens two-photon endoscopy for high-speed volumetric and deep brain imaging. *Biomed Opt Express* 12:162–172.
- Cho WH, Noh K, Lee BH, et al (2022) Hippocampal astrocytes modulate anxiety-like behavior. *Nat Commun* 13:6536.
- Choudary P V., Molnar M, Evans SJ, et al (2005) Altered cortical glutamatergic and GABAergic signal transmission with glial involvement in depression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:15653–15658.
- Chung WS, Allen NJ, Eroglu C (2015) Astrocytes Control Synapse Formation, Function, and Elimination. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7:a020370.
- Clancy B, Darlington RB, Finlay BL (2001) Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience* 105:7–17.
- Codeluppi SA, Chatterjee D, Prevot TD, et al (2021) Chronic Stress Alters Astrocyte Morphology in Mouse Prefrontal Cortex. *Int J Neuropsychopharmacol* 24:842–853.
- Collins DP, Anastasiades PG, Marlin JJ, Carter AG (2018) Reciprocal Circuits Linking the Prefrontal Cortex with Dorsal and Ventral Thalamic Nuclei. *Neuron* 98:366-379.e4.
- Cook SC, Wellman CL (2004) Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *J Neurobiol* 60:236–248.
- Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ (1990) Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* 247:470–473.
- Correia PA, Lottem E, Banerjee D, et al (2017) Transient inhibition and long-term facilitation of locomotion by phasic optogenetic activation of serotonin neurons. *Elife* 6:e20975.
- Cortes-Altamirano JL, Olmos-Hernández A, Jaime HB, et al (2018) Review: 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> and 5-HT<sub>7</sub> Receptors and their Role in the Modulation of Pain Response in the Central Nervous System. *Curr Neuropharmacol* 16:210.
- Cotrina ML, Lin JHC, López-García JC, et al (2000) ATP-Mediated Glia Signaling. *J Neurosci* 20:2835–2844.
- Coulter OR, Walker CD, Risher ML (2023) Astrocyte-specific Ca<sup>2+</sup> activity: Mechanisms of action, experimental tools, and roles in ethanol-induced dysfunction. *Biochem Cell Biol* 101:410–421.

- Courtney CD, Sobieski C, Ramakrishnan C, et al (2023) Opto $\alpha$ 1AR activation in astrocytes modulates basal hippocampal synaptic excitation and inhibition in a stimulation-specific manner. *Hippocampus* 33:1277–1291.
- Covelo A, Araque A (2018) Neuronal activity determines distinct gliotransmitter release from a single astrocyte. *Elife* 7:e32237.
- Cui Y, Yang Y, Ni Z, et al (2018) Astroglial Kir4.1 in the lateral habenula drives neuronal bursts in depression. *Nature* 554:323–327.
- Czéh B, Di Benedetto B (2013) Antidepressants act directly on astrocytes: Evidences and functional consequences. *Eur Neuropsychopharmacol* 23:171–185.
- Dahlström A, Fuxe K (1964) Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* 20:398–9.
- Dallman MF, Pecoraro N, Akana SF, et al (2003) Chronic stress and obesity: A new view of “comfort food.” *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:11696–11701.
- D’Ascenzo M, Fellin T, Terunuma M, et al (2007) mGluR5 stimulates gliotransmission in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:1995–2000.
- Davenport MD, Tiefenbacher S, Lutz CK, et al (2006) Analysis of endogenous cortisol concentrations in the hair of rhesus macaques. *Gen Comp Endocrinol* 147:255–261.
- Davis S, Thomas A, Perry R, et al (2002) Glial fibrillary acidic protein in late life major depressive disorder: an immunocytochemical study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 73:556–560.
- de Almeida J, Mengod G (2007) Quantitative analysis of glutamatergic and GABAergic neurons expressing 5-HT<sub>2A</sub> receptors in human and monkey prefrontal cortex. *J Neurochem* 103:475–486.
- DeFelipe J, Arellano JI, Gómez A, et al (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.
- de Jong TR, Veening JG, Waldinger MD, et al (2006) Serotonin and the neurobiology of the ejaculatory threshold. *Neurosci Biobehav Rev* 30:893–907.
- Deisseroth K (2015) Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience. *Nat Neurosci* 18:1213–1225.
- Deiters O (1865) *Untersuchungen über Gehirn und Rückenmark des Menschen und der Säugethiere*. Vieweg, Braunschweig.
- Dembrow NC, Zemelman B V., Johnston D (2015) Temporal Dynamics of L5 Dendrites in Medial Prefrontal Cortex Regulate Integration Versus Coincidence Detection of Afferent Inputs. *J Neurosci* 35:4501–4514.
- Di Castro MA, Chuquet J, Liaudet N, et al (2011) Local Ca<sup>2+</sup> detection and modulation of synaptic release by astrocytes. *Nat Neurosci* 14:1276–1284.
- Dieterich A, Srivastava P, Sharif A, et al (2019) Chronic corticosterone administration induces negative valence and impairs positive valence behaviors in mice. *Transl Psychiatry* 9:337.
- Dölen G, Darvishzadeh A, Huang KW, Malenka RC (2013) Social reward requires coordinated activity of nucleus accumbens oxytocin and serotonin. *Nature* 501:179–184.
- Dominguez G, Henkous N, Prevot T, et al (2019) Sustained corticosterone rise in the prefrontal cortex is a key factor for chronic stress-induced working memory deficits in mice. *Neurobiol Stress* 10:100161.
- Drevets WC, Price JL, Furey ML (2008) Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. *Brain Struct and Funct* 213:93–118.

- Duan S, Anderson CM, Keung EC, et al (2003) P2X7 Receptor-Mediated Release of Excitatory Amino Acids from Astrocytes. *J Neurosci* 23:1320–1328.
- Duman RS, Aghajanian GK, Sanacora G, Krystal JH (2016) Synaptic plasticity and depression: new insights from stress and rapid-acting antidepressants. *Nat Med* 22:238–249.
- Dupuy V, Prieur M, Pizzoccaro A, et al (2023) Spatiotemporal dynamics of 5-HT6 receptor ciliary localization during mouse brain development. *Neurobiol Dis* 176:105949.
- Durkee CA, Araque A (2019) Diversity and Specificity of Astrocyte–neuron Communication. *Neuroscience* 396:73–78.
- Durkee CA, Covelo A, Lines J, et al (2019) Gi/o protein-coupled receptors inhibit neurons but activate astrocytes and stimulate gliotransmission. *Glia* 67:1076–1093.
- Edgar N, McClung CA (2013) Major depressive disorder: A loss of circadian synchrony? *BioEssays* 35:940–944.
- Elmer T, Stadtfeld C (2020) Depressive symptoms are associated with social isolation in face-to-face interaction networks. *Sci Rep* 10:1444.
- Elsayed M, Magistretti PJ (2015) A New Outlook on Mental Illnesses: Glial Involvement Beyond the Glue. *Front Cell Neurosci* 9:1–20.
- Erickson EK, DaCosta AJ, Mason SC, et al (2020) Cortical astrocytes regulate ethanol consumption and intoxication in mice. *Neuropsychopharmacology* 46:500–508.
- Erickson RL, Browne CA, Lucki I (2017) Hair corticosterone measurement in mouse models of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Physiol Behav* 178:166–171.
- Erkizia-Santamaría I, Alles-Pascual R, Horrillo I, et al (2022) Serotonin 5-HT2A, 5-HT2c and 5-HT1A receptor involvement in the acute effects of psilocybin in mice. In vitro pharmacological profile and modulation of thermoregulation and head-twitch response. *Biomed Pharmacother* 154:113612.
- Ernst C, Nagy C, Kim S, et al (2011) Dysfunction of astrocyte connexins 30 and 43 in dorsal lateral prefrontal cortex of suicide completers. *Biol Psychiatry* 70:312–319.
- Eroglu C, Barres BA (2010) Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature* 468:223–231.
- Etiévant A, Oosterhof C, Bétry C, et al (2015) Astroglial Control of the Antidepressant-Like Effects of Prefrontal Cortex Deep Brain Stimulation. *EBioMedicine* 2:898–908.
- Feldman JM (2004) Serotonin. *Encyclopedia of Gastroenterology* 346–351.
- Fellin T, Pascual O, Gobbo S, et al (2004) Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* 43:729–743.
- Ferrés-Coy A, Galofré M, Pilar-Cuellar F, et al (2015) Therapeutic antidepressant potential of a conjugated siRNA silencing the serotonin transporter after intranasal administration. *Mol Psychiatry* 21:328–338.
- Ferrés-Coy A, Pilar-Cuellar F, Vidal R, et al (2013) RNAi-mediated serotonin transporter suppression rapidly increases serotonergic neurotransmission and hippocampal neurogenesis. *Transl Psychiatry* 3:e211.
- Fiacco TA, Agulhon C, McCarthy KD (2009) Sorting Out Astrocyte Physiology from Pharmacology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 49:151–174.
- Fiacco TA, McCarthy KD (2004) Intracellular Astrocyte Calcium Waves In Situ Increase the Frequency of Spontaneous AMPA Receptor Currents in CA1 Pyramidal Neurons. *J Neurosci* 24:722–732.

- Fiacco TA, McCarthy KD (2018) Multiple Lines of Evidence Indicate That Gliotransmission Does Not Occur under Physiological Conditions. *J Neurosci* 38:3–13.
- Filatova E V, Shadrina MI, Slominsky PA, et al (2021) Major Depression: One Brain, One Disease, One Set of Intertwined Processes. *Cells* 10:1283.
- Fujii Y, Maekawa S, Morita M (2017) Astrocyte calcium waves propagate proximally by gap junction and distally by extracellular diffusion of ATP released from volume-regulated anion channels. *Sci Rep* 7:13115.
- Fullana MN, Covelo A, Bortolozzi A, et al (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* 29:1288–1294.
- Fullana MN, Ruiz-Bronchal E, Ferrés-Coy A, et al (2019b) Regionally selective knockdown of astroglial glutamate transporters in infralimbic cortex induces a depressive phenotype in mice. *Glia* 67:1122–1137.
- Gabbott PLA, Warner TA, Jays PRL, et al (2005) Prefrontal cortex in the rat: Projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *J Comp Neurol* 492:145–177.
- Gadberry TM, Goodman J, Packard MG (2022) Chronic corticosterone administration in adolescence enhances dorsolateral striatum-dependent learning in adulthood. *Front Behav Neurosci* 16:970304.
- Garaschuk O, Milos RI, Konnerth A (2006) Targeted bulk-loading of fluorescent indicators for two-photon brain imaging in vivo. *Nat Protoc* 1:380–386.
- Giaume C, McCarthy KD (1996) Control of gap-junctional communication in astrocytic networks. *Trends Neurosci* 19:319–325.
- Gobert A, Rivet JM, Cistarelli L, Millan MJ (1997) Potentiation of the Fluoxetine-Induced Increase in Dialysate Levels of Serotonin (5-HT) in the Frontal Cortex of Freely Moving Rats by Combined Blockade of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> Receptors with WAY 100,635 and GR 127,935. *J Neurochem* 68:1159–1163.
- Goenaga J, Araque A, Kofuji P, Herrera Moro Chao D (2023) Calcium signaling in astrocytes and gliotransmitter release. *Front Synaptic Neurosci* 15:1138577.
- Goldberg JF, Nasrallah HA (2022) Major depression is a serious and potentially fatal brain syndrome requiring pharmacotherapy or neuromodulation, and psychotherapy. *Psychol Med* 52:1423–1425.
- Golden SA, Covington HE, Berton O, Russo SJ (2011) A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. *Nat Protoc* 6:1183–1191.
- Goldstein SAN, Bockenhauer D, O’Kelly I, Zilberberg N (2001) Potassium leak channels and the KCNK family of two-p-domain subunits. *Nat Rev Neurosci* 2:175–184.
- Golgi C (1873) Suella Struttura della sostanza grigia del cervello. *Gazzetta Medica Italiana, Lombardia* 33:244–246.
- Golgi C (1885) Sulla fina anatomia degli organi centrali del systema nervoso. Reggio Emilia: Tip. S. Calderini e Figlio.
- Golovina VA, Blaustein MP (1997) Spatially and Functionally Distinct Ca<sup>2+</sup> Stores in Sarcoplasmic and Endoplasmic Reticulum. *Science* 275:1643–1648.
- Gomez JL, Bonaventura J, Lesniak W, et al (2017) Chemogenetics revealed: DREADD occupancy and activation via converted clozapine. *Science* 357:503–507.



- Gómez-Gonzalo M, Losi G, Chiavegato A, et al (2010) An Excitatory Loop with Astrocytes Contributes to Drive Neurons to Seizure Threshold. *PLoS Biol* 8:1000352.
- Gómez-Gonzalo M, Navarrete M, Perea G, et al (2015) Endocannabinoids Induce Lateral Long-Term Potentiation of Transmitter Release by Stimulation of Gliotransmission. *Cereb Cortex* 25:3699–3712.
- Gong S, Miao YL, Jiao GZ, et al (2015) Dynamics and Correlation of Serum Cortisol and Corticosterone under Different Physiological or Stressful Conditions in Mice. *PLoS One* 10:e0117503.
- González-Arias C, Perea G (2019) Gliotransmission at Tripartite Synapses. In: *Computational Glioscience*. Springer Nature, pp 213–226.
- Goodfellow NM, Benekareddy M, Vaidya VA, Lambe EK (2009) Layer II/III of the prefrontal cortex: Inhibition by the serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor in development and stress. *J Neurosci* 29:10094–10103.
- Gordleeva SY, Tsybina YA, Krivonosov MI, et al (2021) Modeling Working Memory in a Spiking Neuron Network Accompanied by Astrocytes. *Front Cell Neurosci* 15:631485.
- Gourine A V., Kasymov V, Marina N, et al (2010) Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science* 329:571–575.
- Gourley SL, Taylor JR (2009) Recapitulation and Reversal of a Persistent Depression-like Syndrome in Rodents. *Curr Protoc Neurosci* 9:9.32.
- Gradinaru V, Mogri M, Thompson KR, et al (2009) Optical deconstruction of parkinsonian neural circuitry. *Science* 324:354–359.
- Groenewegen HJ, Uylings HBM (2000) The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information. *Prog Brain Res* 126:3–28.
- Grosche J, Matyash V, Möller T, et al (1999) Microdomains for neuron–glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. *Nat Neurosci* 2:139–143.
- Guerra-Gomes S, Sousa N, Pinto L, Oliveira JF (2018) Functional roles of astrocyte calcium elevations: From synapses to behavior. *Front Cell Neurosci* 11:427.
- Guiard BP, Di Giovanni G (2015) Central serotonin-2A (5-HT<sub>2A</sub>) receptor dysfunction in depression and epilepsy: The missing link? *Front Pharmacol* 6:134753.
- Gunaydin LA, Grosenick L, Finkelstein JC, et al (2014) Natural Neural Projection Dynamics Underlying Social Behavior. *Cell* 157:1535–1551.
- Habbas S, Santello M, Becker D, et al (2015) Neuroinflammatory TNF $\alpha$  Impairs Memory via Astrocyte Signaling. *Cell* 163:1730–1741.
- Hagberg GB, Blomstrand F, Nilsson M, et al (1998) Stimulation of 5-HT(2A) receptors on astrocytes in primary culture opens voltage-independent Ca<sup>2+</sup> channels. *Neurochem Int* 32:153–162.
- Halassa MM, Fellin T, Haydon PG (2007a) The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med* 13:54–63.
- Halassa MM, Fellin T, Takano H, et al (2007b) Synaptic Islands Defined by the Territory of a Single Astrocyte. *J Neurosci* 27:6473–6477.
- Hall JD, DeWitte C, Ness TJ, Robbins MT (2015) Serotonin enhances urinary bladder nociceptive processing via a 5-HT<sub>3</sub> receptor mechanism. *Neurosci Lett* 604:97–102.

- Hamani C, MacHado DC, Hipólido DC, et al (2012) Deep brain stimulation reverses anhedonic-like behavior in a chronic model of depression: Role of serotonin and brain derived neurotrophic factor. *Biol Psychiatry* 71:30–35.
- Hamon M, Blier P (2013) Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 45:54–63.
- Hannon J, Hoyer D (2008) Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res* 195:198–213.
- Hattar S, Liao HW, Takao M (2002) Melanopsin-Containing Retinal Ganglion Cells: Architecture, Projections, and Intrinsic Photosensitivity. *Science* 295:1065–1070.
- Haydon PG (2000) Neuroglial networks: neurons and glia talk to each other. *Curr Biol* 10:R712–4.
- Haydon PG, Carmignoto G (2006) Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol Rev* 86:1009–1031.
- Hay-Schmidt A (2000) The evolution of the serotonergic nervous system. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 267:1071–1079.
- Henneberger C, Papouin T, Oliet SHR, Rusakov DA (2010) Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature* 463:232–236.
- Hervás I, Vilaró MT, Romero L, et al (2001) Desensitization of 5-HT<sub>1A</sub> Autoreceptors by a Low Chronic Fluoxetine Dose Effect of the Concurrent Administration of WAY-100635. *Neuropsychopharmacology* 24:11–20.
- Hines DJ, Schmitt LI, Hines RM, et al (2013) Antidepressant effects of sleep deprivation require astrocyte-dependent adenosine mediated signaling. *Transl Psychiatry*. 3:e212.
- Hirst WD, Cheung NY, Rattray M, et al (1998) Cultured astrocytes express messenger RNA for multiple serotonin receptor subtypes, without functional coupling of 5-HT<sub>1</sub> receptor subtypes to adenylyl cyclase. *Brain Res Mol Brain Res* 61:90–99.
- Hirst WD, Price GW, Rattray M, Wilkin GP (1997) Identification of 5-hydroxytryptamine receptors positively coupled to adenylyl cyclase in rat cultured astrocytes. *Br J Pharmacol* 120:509–515.
- Höfer T, Venance L, Giaume C (2002) Control and plasticity of intercellular calcium waves in astrocytes: a modeling approach. *J Neurosci* 22:4850–9.
- Holtzclaw LA, Pandhit S, Bare DJ, et al (2002) Astrocytes in adult rat brain express type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Glia* 39:69–84.
- Holtzheimer PE, Mayberg HS (2011) Deep Brain Stimulation for Psychiatric Disorders. *Annu Rev Neurosci* 34:289–307.
- Honjoh S, Sasai S, Schiereck SS, et al (2018) Regulation of cortical activity and arousal by the matrix cells of the ventromedial thalamic nucleus. *Nat Commun* 9:2100.
- Iñiguez SD, Aubry A, Riggs LM, et al (2016) Social defeat stress induces depression-like behavior and alters spine morphology in the hippocampus of adolescent male C57BL/6 mice. *Neurobiol Stress* 5:54–64.
- Innocenti B, Parpura V, Haydon PG (2000) Imaging Extracellular Waves of Glutamate during Calcium Signaling in Cultured Astrocytes. *J Neurosci* 20:1800–1808.
- Inoue A, Raimondi F, Kadji FMN, et al (2019) Illuminating G-Protein-Coupling Selectivity of GPCRs. *Cell* 177:1933–1947.e25.
- Janet R, Costes N, Mérida I, et al (2023) Relationships between serotonin availability and frontolimbic response to fearful and threatening faces. *Sci Rep* 13:1558.

- Jennings A, Tyurikova O, Bard L, et al (2017) Dopamine elevates and lowers astroglial  $\text{Ca}^{2+}$  through distinct pathways depending on local synaptic circuitry. *Glia* 65:447–459.
- Jiang R, Diaz-Castro B, Looger LL, Khakh BS (2016) Dysfunctional Calcium and Glutamate Signaling in Striatal Astrocytes from Huntington's Disease Model Mice. *J Neurosci* 36:3453–3470.
- John CS, Smith KL, Van't Veer A, et al (2012) Blockade of Astrocytic Glutamate Uptake in the Prefrontal Cortex Induces Anhedonia. *Neuropsychopharmacology* 37:2467–2475.
- Jourdain P, Bergersen LH, Bhaukaurally K, et al (2007) Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat Neurosci* 10:331–339.
- Jun M, Xiaolong Q, Chaojuan Y, et al (2018) Calhm2 governs astrocytic ATP releasing in the development of depression-like behaviors. *Mol Psychiatry* 23:883–891.
- Kalliokoski O, Jellestad FK, Murison R (2019) A systematic review of studies utilizing hair glucocorticoids as a measure of stress suggests the marker is more appropriate for quantifying short-term stressors. *Sci Rep* 9:11997.
- Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M (1998) Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci* 1:683–692.
- Kessler RC, Berglund P, Demler O, et al (2003) The Epidemiology of Major Depressive Disorder: Results From the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *JAMA* 289:3095–3105.
- Khakh BS, McCarthy KD (2015) Astrocyte calcium signaling: from observations to functions and the challenges therein. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7:a020404.
- Khakh BS, Sofroniew MV (2015) Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nat Neurosci* 18:942–952.
- Khodoruth MAS, Estudillo-Guerra MA, Pacheco-Barrios K, et al (2022) Glutamatergic System in Depression and Its Role in Neuromodulatory Techniques Optimization. *Front Psychiatry* 13:886918.
- Kim CK, Yang SJ, Pichamoorthy N, et al (2016) Simultaneous fast measurement of circuit dynamics at multiple sites across the mammalian brain. *Nat Methods* 13:325–328.
- Kim JG, Suyama S, Koch M, et al (2014) Leptin signaling in astrocytes regulates hypothalamic neuronal circuits and feeding. *Nat Neurosci* 17:908–910.
- Kimbrell TA, Ketter TA, George MS, et al (2002) Regional cerebral glucose utilization in patients with a range of severities of unipolar depression. *Biol Psychiatry* 51:237–252.
- Kinoshita M, Hirayama Y, Fujishita K, et al (2018) Anti-Depressant Fluoxetine Reveals its Therapeutic Effect Via Astrocytes. *EBioMedicine* 32:72–83.
- Kjaerby C, Athilingam J, Robinson SE, et al (2016) Serotonin 1B Receptors Regulate Prefrontal Function by Gating Callosal and Hippocampal Inputs. *Cell Rep* 17:2882–2890.
- Klapoetke NC, Murata Y, Kim SS, et al (2014) Independent optical excitation of distinct neural populations. *Nat Methods* 11:338–346.
- Koizumi S, Fujishita K, Inoue K (2005) Regulation of cell-to-cell communication mediated by astrocytic ATP in the CNS. *Purinergic Signal* 1:211.
- Kojima M, Matsui K, Mizui T (2019) BDNF pro-peptide: physiological mechanisms and implications for depression. *Cell Tissue Res* 377:73–79.
- Koyama Y (2015) Functional alterations of astrocyte in mental disorders: Pharmacological significance as a drug target. *Front Cell Neurosci* 9:144995.

- Krishnan V, Nestler EJ (2011) Animal models of depression: molecular perspectives. *Curr Top Behav Neurosci* 7:121–147.
- Kristiansen K, Dahl SG (1996) Molecular modeling of serotonin, ketanserin, ritanserin and their 5-HT<sub>2C</sub> receptor interactions. *Eur J Pharmacol* 306:195–210.
- Kugaya A, Sanacora G (2005) Beyond Monoamines: Glutamatergic Function in Mood Disorders. *CNS Spectr* 10:808–819.
- Lambe EK, Aghajanian GK (2001) The Role of Kv1.2-Containing Potassium Channels in Serotonin-Induced Glutamate Release from Thalamocortical Terminals in Rat Frontal Cortex. *J Neurosci* 21:9955–63.
- Lambe EK, Goldman-Rakic PS, Aghajanian GK (2000) Serotonin Induces EPSCs Preferentially in Layer V Pyramidal Neurons of the Frontal Cortex in the Rat. *Cereb Cortex* 10:974–980.
- Lamiay J, Schneider B, Loric S, et al (2006) Serotonin transport and serotonin transporter-mediated antidepressant recognition are controlled by 5-HT<sub>2B</sub> receptor signaling in serotonergic neuronal cells. *FASEB J* 20:1843–1854.
- Larramona-Arcas R, González-Arias C, Perea G, et al (2020) Sex-dependent calcium hyperactivity due to lysosomal-related dysfunction in astrocytes from APOE4 versus APOE3 gene targeted replacement mice. *Mol Neurodegener* 15:35.
- Lee AT, Gee SM, Vogt D, et al (2014) Pyramidal Neurons in Prefrontal Cortex Receive Subtype-Specific Forms of Excitation and Inhibition. *Neuron* 81:61–68.
- Leger M, Quiedeville A, Bouet V, et al (2013) Object recognition test in mice. *Nat Protoc* 8:2531–2537.
- Lehre KR, Rusakov DA (2002) Asymmetry of glia near central synapses favors presynaptically directed glutamate escape. *Biophys J* 83:125–134.
- Lenhossék M (1895) *Der feinere Bau des Nervensystems im Lichte neuester Forschung*. Fischer's Medicinische Buchhandlung H. Kornfield, Berlin.
- Lerner TN, Shilyansky C, Davidson TJ, et al (2015) Intact-Brain Analyses Reveal Distinct Information Carried by SNc Dopamine Subcircuits. *Cell* 162:635–647.
- Lesch KP, Waider J (2012) Serotonin in the Modulation of Neural Plasticity and Networks: Implications for Neurodevelopmental Disorders. *Neuron* 76:175–191.
- Li B, Dong L, Wang B, et al (2012) Cell type-specific gene expression and editing responses to chronic fluoxetine treatment in the in vivo mouse brain and their relevance for stress-induced anhedonia. *Neurochem Res* 37:2480–2495.
- Li B, Zhang S, Li M, et al (2010) Serotonin increases ERK1/2 phosphorylation in astrocytes by stimulation of 5-HT<sub>2B</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors. *Neurochem Int* 57:432–439.
- Li CT, Yang KC, Lin WC (2019) Glutamatergic dysfunction and glutamatergic compounds for major psychiatric disorders: Evidence from clinical neuroimaging studies. *Front Psychiatry* 10:767.
- Li D, Héroult K, Silm K, et al (2013) Lack of Evidence for Vesicular Glutamate Transporter Expression in Mouse Astrocytes. *J Neurosci* 33:4434.
- Li X, Zima A V, Sheikh F, et al (2005) Endothelin-1-Induced Arrhythmogenic Ca<sup>2+</sup> Signaling Is Abolished in Atrial Myocytes of Inositol-1,4,5-Trisphosphate(IP<sub>3</sub>)-Receptor Type 2-Deficient Mice. *Circ Res* 96:1274–1281.
- Li Y, Li L, Wu J, et al (2020) Activation of astrocytes in hippocampus decreases fear memory through adenosine A1 receptors. *Elife* 9:1–25.
- Lia A, Henriques VJ, Zonta M, et al (2021) Calcium Signals in Astrocyte Microdomains, a Decade of Great Advances. *Front Cell Neurosci* 15:673433.

- Lin L, Herselman MF, Zhou XF, Bobrovskaya L (2022) Effects of corticosterone on BDNF expression and mood behaviours in mice. *Physiol Behav* 247:113721.
- Lin SS, Zhou B, Chen BJ, et al (2023) Electroacupuncture prevents astrocyte atrophy to alleviate depression. *Cell Death Dis* 14:1–10.
- Lines J, Martin ED, Kofuji P, et al (2020) Astrocytes modulate sensory-evoked neuronal network activity. *Nat Commun* 11:3689.
- Linne ML, Aćimović J, Saudargiene A, Manninen T (2022) Neuron–Glia Interactions and Brain Circuits. *Adv Exp Med Biol* 1359:87–103.
- Little JP, Carter AG (2013) Synaptic Mechanisms Underlying Strong Reciprocal Connectivity between the Medial Prefrontal Cortex and Basolateral Amygdala. *J Neurosci* 33:15333–15342.
- Liu CS, Adibfar A, Herrmann N, et al (2017) Evidence for inflammation-associated depression. *Curr Top Behav Neurosci* 31:3–30.
- Liu J, Mo J-W, Wang X, et al (2022) Astrocyte dysfunction drives abnormal resting-state functional connectivity in depression. *Sci Adv* 8:eabo2098.
- Liu X, Carter AG (2018) Ventral Hippocampal Inputs Preferentially Drive Corticocortical Neurons in the Infralimbic Prefrontal Cortex. *J Neurosci* 38:7351–7363.
- Liu X, Ying J, Wang X, et al (2021) Astrocytes in Neural Circuits: Key Factors in Synaptic Regulation and Potential Targets for Neurodevelopmental Disorders. *Front Mol Neurosci* 14:729273.
- Liu Y, Zhao J, Fan X, Guo W (2019) Dysfunction in Serotonergic and Noradrenergic Systems and Somatic Symptoms in Psychiatric Disorders. *Front Psychiatry* 10:286.
- Liu Z, Lin R, Luo M (2020) Reward Contributions to Serotonergic Functions. *Annu Rev Neurosci* 43:141–162.
- Losi G, Mariotti L, Sessolo M, Carmignoto G (2017) New tools to study astrocyte Ca<sup>2+</sup> signal dynamics in brain networks in vivo. *Front Cell Neurosci* 11:235080.
- Lowry CA (2002) Functional Subsets of Serotonergic Neurones: Implications for Control of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. *J Neuroendocrinol* 14:911–923.
- Lu CL, Ren J, Mo JW, et al (2022) Glucocorticoid Receptor-Dependent Astrocytes Mediate Stress Vulnerability. *Biol Psychiatry* 92:204–215.
- Lu J, Tucciarone J, Padilla-Coreano N, et al (2017) Selective inhibitory control of pyramidal neuron ensembles and cortical subnetworks by chandelier cells. *Nat Neurosci* 20:1377–1383.
- Lugaro E (1907) Sulle funzioni della nevroglia. *Riv Patol Nerv Ment* 12:225–233.
- Lui E, Salim M, Chahal M, et al (2017) Chronic corticosterone-induced impaired cognitive flexibility is not due to suppressed adult hippocampal neurogenesis. *Behav Brain Res* 332:90–98.
- Luo R, Zhou B, Liao P, et al (2023) Disrupting cortical astrocyte Ca<sup>2+</sup> signaling in developing brain induces social deficits and depressive-like behaviors. *Glia* 71:1592–1606.
- Lyon KA, Allen NJ (2022) From Synapses to Circuits, Astrocytes Regulate Behavior. *Front Neural Circuits* 15:136.
- Machado-Santos AR, Alves ND, Araújo B, et al (2021) Astrocytic plasticity at the dorsal dentate gyrus on an animal model of recurrent depression. *Neuroscience* 454:94–104.
- Macrì S (2017) Neonatal corticosterone administration in rodents as a tool to investigate the maternal programming of emotional and immune domains. *Neurobiol Stress* 6:22–30.

- Magistretti PJ, Allaman I (2018) Lactate in the brain: from metabolic end-product to signalling molecule. *Nat Rev Neurosci* 19:235–249.
- Mahé C, Bernhard M, Bobirnac I, et al (2004) Functional expression of the serotonin 5-HT<sub>7</sub> receptor in human glioblastoma cell lines. *Br J Pharmacol* 143:404–410.
- Manji HK, Drevets WC, Charney DS (2001) The cellular neurobiology of depression. *Nat Med* 7:541–547.
- Mann JJ (1999) Role of the Serotonergic System in the Pathogenesis of Major Depression and Suicidal Behavior. *Neuropsychopharmacology* 21:99–105.
- Manvich DF, Webster KA, Foster SL, et al (2018) The DREADD agonist clozapine N-oxide (CNO) is reverse-metabolized to clozapine and produces clozapine-like interoceptive stimulus effects in rats and mice. *Sci Rep* 8:1–10.
- Marek GJ, Carpenter LL, McDougle CJ, Price LH (2003) Synergistic Action of 5-HT<sub>2A</sub> Antagonists and Selective Serotonin Reuptake Inhibitors in Neuropsychiatric Disorders. *Neuropsychopharmacology* 28:402–412.
- Marek R, Jin J, Goode TD, et al (2018) Hippocampus-driven feed-forward inhibition of the prefrontal cortex mediates relapse of extinguished fear. *Nat Neurosci* 21:384–392.
- Mariotti L, Losi G, Lia A, et al (2018) Interneuron-specific signaling evokes distinctive somatostatin-mediated responses in adult cortical astrocytes. *Nat Commun* 9:1–14.
- Martín R, Bajo-Grañeras R, Moratalla R, et al (2015) Circuit-specific signaling in astrocyte-neuron networks in basal ganglia pathways. *Science* 349:730–734.
- Martin-Fernandez M, Jamison S, Robin LM, et al (2017) Synapse-specific astrocyte gating of amygdala-related behavior. *Nat Neurosci* 20:1540–1548.
- Martín-Ruiz R, Victoria Puig M, Celada P, et al (2001) Control of Serotonergic Function in Medial Prefrontal Cortex by Serotonin-2A Receptors through a Glutamate-Dependent Mechanism. *J Neurosci* 21:9856–9866.
- Masamoto K, Uekawa M, Watanabe T, et al (2015) Unveiling astrocytic control of cerebral blood flow with optogenetics. *Sci Rep* 5:1–11.
- Matthews GA, Nieh EH, Vander Weele CM, et al (2016) Dorsal Raphe Dopamine Neurons Represent the Experience of Social Isolation. *Cell* 164:617–631.
- McEwen BS, Sapolsky RM (1995) Stress and cognitive function. *Curr Opin Neurobiol* 5:205–216.
- McLay RN, Freeman SM, Zadina JE (1998) Chronic Corticosterone Impairs Memory Performance in the Barnes Maze. *Physiol Behav* 63:933–937.
- McLean CP, Asnaani A, Litz BT, Hofmann SG (2011) Gender differences in anxiety disorders: Prevalence, course of illness, comorbidity and burden of illness. *J Psychiatr Res* 45:1027–1035.
- Mederos S, González-Arias C, Perea G (2018) Astrocyte–Neuron Networks: A Multilane Highway of Signaling for Homeostatic Brain Function. *Front Synaptic Neurosci* 10:45.
- Mederos S, Hernández-Vivanco A, Ramírez-Franco J, et al (2019) Melanopsin for precise optogenetic activation of astrocyte-neuron networks. *Glia* 67:915–934.
- Mederos S, Sánchez-Puelles C, Esparza J, et al (2021) GABAergic signaling to astrocytes in the prefrontal cortex sustains goal-directed behaviors. *Nat Neurosci* 24:82–92.
- Meneses A (1998) Physiological, pathophysiological and therapeutic roles of 5-HT systems in learning and memory. *Rev Neurosci* 9:275–289.

- Michelsen KA, Schmitz C, Steinbusch HWM (2007) The dorsal raphe nucleus—From silver stainings to a role in depression. *Brain Res Rev* 55:329–342.
- Miguel-Hidalgo JJ (2022) Astroglia in the Vulnerability to and Maintenance of Stress-Mediated Neuropathology and Depression. *Front Cell Neurosci* 16:869779.
- Miguel-Hidalgo JJ, Baucom C, Dilley G, et al (2000) Glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the prefrontal cortex distinguishes younger from older adults in major depressive disorder. *Biol Psychiatry* 48:861–873.
- Miguel-Hidalgo JJ, Waltzer R, Whittom AA, et al (2010) Glial and glutamatergic markers in depression, alcoholism, and their comorbidity. *J Affect Disord* 127:230–240.
- Millan MJ (2005) N-Methyl-d-aspartate receptors as a target for improved antipsychotic agents: Novel insights and clinical perspectives. *Psychopharmacology (Berl)* 179:30–53.
- Min R, Nevian T (2012) Astrocyte signaling controls spike timing-dependent depression at neocortical synapses. *Nat Neurosci* 15:746–753.
- Mizuno GO, Wang Y, Shi G, et al (2018) Aberrant Calcium Signaling in Astrocytes Inhibits Neuronal Excitability in a Human Down Syndrome Stem Cell Model. *Cell Rep* 24:355–365.
- Moncrieff J, Cooper RE, Stockmann T, et al (2022) The serotonin theory of depression: a systematic umbrella review of the evidence. *Mol Psychiatry* 28:3243–3256.
- Montgomery SA (2008) The under-recognized role of dopamine in the treatment of major depressive disorder. *Int Clin Psychopharmacol* 23:63–69.
- Monti JM (2011) Serotonin control of sleep-wake behavior. *Sleep Med Rev* 15:269–281.
- Moore CM, Christensen JD, Lafer B, et al (2006) Lower levels of nucleoside triphosphate in the basal ganglia of depressed subjects: a phosphorous-31 magnetic resonance spectroscopy study. *Am J Psychiatry* 154:116–118.
- Moret C, Briley M (2011) The importance of norepinephrine in depression. *Neuropsychiatr Dis Treat* 7:9–13.
- Morita M (2023) Modern Microscopic Approaches to Astrocytes. *Int J Mol Sci* 24:5883.
- Morquette P, Verdier D, Kadala A, et al (2015) An astrocyte-dependent mechanism for neuronal rhythmogenesis. *Nat Neurosci* 18:844–854.
- Mu Y, Bennett D V., Rubinov M, et al (2019) Glia Accumulate Evidence that Actions Are Futile and Suppress Unsuccessful Behavior. *Cell* 178:27–43.e19.
- Murphy-Royal C, Ching SN, Papouin T (2023) A conceptual framework for astrocyte function. *Nat Neurosci* 26:1848–1856.
- Murphy-Royal C, Johnston AD, Boyce AKJ, et al (2020) Stress gates an astrocytic energy reservoir to impair synaptic plasticity. *Nat Commun* 11:2014.
- Murray CJL, Vos T, Lozano R, et al (2012) Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet* 380:2197–2223.
- Murrough JW, Iosifescu D V., Chang LC, et al (2013a) Antidepressant efficacy of ketamine in treatment-resistant major depression: A two-site randomized controlled trial. *Am J Psychiatry* 170:1134–1142.
- Murrough JW, Perez AM, Pillemer S, et al (2013b) Rapid and longer-term antidepressant effects of repeated ketamine infusions in treatment-resistant major depression. *Biol Psychiatry* 74:250–256.

- Nagai J, Yu X, Papouin T, et al (2021) Behaviorally consequential astrocytic regulation of neural circuits. *Neuron* 109:576–596.
- Nagy C, Suderman M, Yang J, et al (2015) Astrocytic abnormalities and global DNA methylation patterns in depression and suicide. *Mol Psychiatry* 20:320–328.
- Nakao K, Singh M, Sapkota K, et al (2022) 5-HT<sub>2A</sub> receptor dysregulation in a schizophrenia relevant mouse model of NMDA receptor hypofunction. *Transl Psychiatry* 12:168.
- Nam MH, Han KS, Lee J, et al (2019) Activation of Astrocytic  $\mu$ -Opioid Receptor Causes Conditioned Place Preference. *Cell Rep* 28:1154–1166.e5.
- Navarrete M, Araque A (2010) Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes. *Neuron* 68:113–126.
- Navarrete M, Perea G, Fernández de Sevilla D, et al (2012) Astrocytes Mediate In Vivo Cholinergic-Induced Synaptic Plasticity. *PLoS Biol* 10:e1001259.
- Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA (2003) New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 26:523–530.
- Nemeroff CB (1996) The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. *Mol Psychiatry* 1:336–42.
- Nett WJ, Oloff SH, McCarthy KD (2002) Hippocampal astrocytes in situ exhibit calcium oscillations that occur independent of neuronal activity. *J Neurophysiol* 87:528–537.
- Nilsson M, Hansson E, Rönnbäck L (1991) Heterogeneity among astroglial cells with respect to 5HT-evoked cytosolic Ca<sup>2+</sup> responses. A microspectrofluorimetric study on single cells in primary culture. *Life Sci* 49:1339–1350.
- Novakovic MM, Korshunov KS, Grant RA, et al (2023) Astrocyte reactivity and inflammation-induced depression-like behaviors are regulated by Orai1 calcium channels. *Nat Commun* 14:5500.
- Nugent AC, Ballard ED, Gould TD, et al (2018) Ketamine has distinct electrophysiological and behavioral effects in depressed and healthy subjects. *Mol Psychiatry* 24:1040–1052.
- Octeau JC, Gangwani MR, Allam SL, et al (2019) Transient, Consequential Increases in Extracellular Potassium Ions Accompany Channelrhodopsin2 Excitation. *Cell Rep* 27:2249.
- Ohno Y, Shimizu S, Tokudome K, et al (2015) New insight into the therapeutic role of the serotonergic system in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 134:104–121.
- Okubo Y, Iino M (2020) Visualization of astrocytic intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization. *J Physiol* 598:1671–1681.
- O'Leary LA, Mechawar N (2021) Implication of cerebral astrocytes in major depression: A review of fine neuroanatomical evidence in humans. *Glia* 69:2077–2099.
- Oliveira JF, Araque A (2022) Astrocyte regulation of neural circuit activity and network states. *Glia* 70:1455–1466.
- Oliveira JF, Sardinha VM, Guerra-Gomes S, et al (2015) Do stars govern our actions? Astrocyte involvement in rodent behavior. *Trends Neurosci* 38:535–549.
- Olivier B (2015) Serotonin: A never-ending story. *Eur J Pharmacol* 753:2–18.
- Orthmann-Murphy JL, Abrams CK, Scherer SS (2008) Gap junctions couple astrocytes and oligodendrocytes. *J Mol Neurosci* 35:101–116.



- Otte C, Gold SM, Penninx BW, et al (2016) Major depressive disorder. *Nature Reviews Disease Primers* 2:16065.
- Otte DM, Barcena de Arellano ML, Bilkei-Gorzo A, et al (2013) Effects of Chronic D-Serine Elevation on Animal Models of Depression and Anxiety-Related Behavior. *PLoS One* 8:e67131.
- Ozawa A, Arakawa H (2021) Chemogenetics drives paradigm change in the investigation of behavioral circuits and neural mechanisms underlying drug action. *Behav Brain Res* 406:113234.
- Pacholko AG, Wotton CA, Bekar LK (2020) Astrocytes—The Ultimate Effectors of Long-Range Neuromodulatory Networks? *Front Cell Neurosci* 14:581075.
- Panatier A, Theodosis DT, Mothet JP, et al (2006) Glia-Derived d-Serine Controls NMDA Receptor Activity and Synaptic Memory. *Cell* 125:775–784.
- Panatier A, Vallée J, Haber M, et al (2011) Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. *Cell* 146:785–798.
- Pandey DK, Mahesh R, kumar AA, et al (2010) A novel 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist exhibits antidepressant-like effects in a battery of rodent behavioural assays: Approaching early-onset antidepressants. *Pharmacol Biochem Behav* 94:363–373.
- Pandey GN, Dwivedi Y, Rizavi HS, et al (2002) Higher expression of serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the postmortem brains of teenage suicide victims. *Am J Psychiatry* 159:419–429.
- Pankratov Y, Lalo U (2015) Role for astroglial  $\alpha$ 1-adrenoreceptors in gliotransmission and control of synaptic plasticity in the neocortex. *Front Cell Neurosci* 9:1–11.
- Pariante CM, Lightman SL (2008) The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends Neurosci* 31:464–468.
- Parnaudeau S, O'Neill PK, Bolkan SS, et al (2013) Inhibition of Mediodorsal Thalamus Disrupts Thalamofrontal Connectivity and Cognition. *Neuron* 77:1151–1162.
- Parpura V, Basarsky TA, Liu F, et al (1994) Glutamate-mediated astrocyte–neuron signalling. *Nature* 369:744–747.
- Parpura V, Zorec R (2010) Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes. *Brain Res Rev* 63:83–92.
- Parri HR, Gould TM, Crunelli V (2001) Spontaneous astrocytic Ca<sup>2+</sup> oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nat Neurosci* 4:803–812.
- Pascual O, Casper KB, Kubera C, et al (2005) Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science* 310:113–116.
- Pasti L, Volterra A, Pozzan T, Carmignoto G (1997) Intracellular Calcium Oscillations in Astrocytes: A Highly Plastic, Bidirectional Form of Communication between Neurons and Astrocytes In Situ. *J Neurosci* 17:7817–7830.
- Patel S, Docampo R (2010) Acidic calcium stores open for business: Expanding the potential for intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling. *Trends Cell Biol* 20:277–286.
- Patel SD, Cameron LP, Olson DE (2021) Sex-Specific Social Effects on Depression-Related Behavioral Phenotypes in Mice. *Life* 11:1327.
- Paukert M, Agarwal A, Cha J, et al (2014) Norepinephrine controls astroglial responsiveness to local circuit activity. *Neuron* 82:1263–1270.
- Paxinos G, Franklin K (2019) Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Compact The Coronal Plates and Diagrams. Academic Press.

- Pazos A, Cortés R, Palacios JM (1985) Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors. *Brain Res* 346:231–249.
- Pazos A, Palacios JM (1985) Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. *Brain Res* 346:205–230.
- Pearlmutter P, DeRose G, Samson C, et al (2020) Sweat and saliva cortisol response to stress and nutrition factors. *Sci Rep* 10:1–11.
- Pehrson AL, Sanchez C (2015) Altered  $\gamma$ -aminobutyric acid neurotransmission in major depressive disorder: a critical review of the supporting evidence and the influence of  $\gamma$ -aminobutyric acid antidepressants. *Drug Des Devel Ther* 9:603–624.
- Pelluru D, Konadhode RR, Bhat NR, Shiromani PJ (2016) Optogenetic stimulation of astrocytes in the posterior hypothalamus increases sleep at night in C57BL/6J mice. *Eur J Neurosci* 43:1298–1306.
- Perea G, Araque A (2005a) Glial calcium signaling and neuron–glia communication. *Cell Calcium* 38:375–382.
- Perea G, Araque A (2005b) Properties of Synaptically Evoked Astrocyte Calcium Signal Reveal Synaptic Information Processing by Astrocytes. *J Neurosci* 25:2192–2203.
- Perea G, Araque A (2007) Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science* 317:1083–1086.
- Perea G, Araque A (2010) GLIA modulates synaptic transmission. *Brain Res Rev* 63:93–102.
- Perea G, Gómez R, Mederos S, et al (2016) Activity-dependent switch of gabaergic inhibition into glutamatergic excitation in astrocyte-neuron networks. *Elife* 5:e20362.
- Perea G, Navarrete M, Araque A (2009) Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* 32:421–431.
- Perea G, Sur M, Araque A (2014a) Neuron-glia networks: integral gear of brain function. *Front Cell Neurosci* 8:1–8.
- Perea G, Yang A, Boyden ES, Sur M (2014b) Optogenetic astrocyte activation modulates response selectivity of visual cortex neurons in vivo. *Nat Commun* 5:1–12.
- Pereira MJ, Ayana R, Holt MG, Arckens L (2023) Chemogenetic manipulation of astrocyte activity at the synapse— a gateway to manage brain disease. *Front Cell Dev Biol* 11:1193130.
- Perez-Alvarez A, Navarrete M, Covelo A, et al (2014) Structural and functional plasticity of astrocyte processes and dendritic spine interactions. *J Neurosci* 34:12738–12744.
- Pohl J, Olmstead MC, Wynne-Edwards KE, et al (2007) Repeated exposure to stress across the childhood-adolescent period alters rats' anxiety- and depression-like behaviors in adulthood: The importance of stressor type and gender. *Behavioral neuroscience* 121:462–474.
- Poopalasundaram S, Knott C, Shamotienko OG, et al (2000) Glial Heterogeneity in Expression of the Inwardly Rectifying K Channel, Kir4.1, in Adult Rat CNS. *Glia* 30:362–72.
- Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M (1978) Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol* 47:379–391.
- Portella MJ, de Diego-Adeliño J, Gómez-Ansón B, et al (2011) Ventromedial prefrontal spectroscopic abnormalities over the course of depression: A comparison among first episode, remitted recurrent and chronic patients. *J Psychiatr Res* 45:427–434.
- Porter JT, McCarthy KD (1996) Hippocampal Astrocytes In Situ Respond to Glutamate Released from Synaptic Terminals. *J Neurosci* 16:5073–5081.

- Porter JT, McCarthy KD (1997) Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Prog Neurobiol* 51:439–455.
- Poskanzer KE, Yuste R (2016) Astrocytes regulate cortical state switching in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:E2675–E2684.
- Poskanzer KE, Yuste R (2011) Astrocytic regulation of cortical UP states. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:18453–18458.
- Prewitt CMF, Herman JP (1997) Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Regulation Following Lesions of the Central Nucleus of the Amygdala. *Stress* 1:263–279.
- Proulx É, Young EJ, Osborne LR, Lambe EK (2010) Enhanced prefrontal serotonin 5-HT(1A) currents in a mouse model of Williams-Beuren syndrome with low innate anxiety. *J Neurodev Disord* 2:99–108.
- 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, et al (2004) In vivo excitation of GABA interneurons in the medial prefrontal cortex through 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Cereb Cortex* 14:1365–75.
- Qin H, He W, Yang C, et al (2020) Monitoring Astrocytic Ca<sup>2+</sup> Activity in Freely Behaving Mice. *Front Cell Neurosci* 14:603095.
- Radley JJ, Rocher AB, Rodriguez A, et al (2008) Repeated stress alters dendritic spine morphology in the rat medial prefrontal cortex. *J Comp Neurol* 507:1141–1150.
- Rajkowska G, Hughes J, Stockmeier CA, et al (2013) Coverage of blood vessels by astrocytic endfeet is reduced in major depressive disorder. *Biol Psychiatry* 73:613–621.
- Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ, Dubey P, et al (2005) Prominent Reduction in Pyramidal Neurons Density in the Orbitofrontal Cortex of Elderly Depressed Patients. *Biol Psychiatry* 58:297.
- Rajkowska G, Stockmeier CA (2013) Astrocyte pathology in major depressive disorder: insights from human postmortem brain tissue. *Curr Drug Targets* 14:1225–36.
- Ramón y Cajal S (1899) *Textura del Sistema Nervioso del Hombre y de los Vertebrados*. Imprenta y Librería de Nicolás Moya, Madrid.
- Rapport MM, Green AA, Page IH (1948) Serum vasoconstrictor, serotonin; chemical inactivation. *J Biol Chem* 176:1237–1241.
- Reeves AMB, Shigetomi E, Khakh BS (2011) Bulk Loading of Calcium Indicator Dyes to Study Astrocyte Physiology: Key Limitations and Improvements Using Morphological Maps. *J Neurosci* 31:9353–9358.
- Ressler K, Nemeroff C (2000) Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders. *Depress Anxiety* 12:2–19
- Ressler KJ, Mayberg HS (2007) Targeting abnormal neural circuits in mood and anxiety disorders: from the laboratory to the clinic. *Nat Neurosci* 10:1116–1124.
- Rial D, Lemos C, Pinheiro H, et al (2016) Depression as a glial-based synaptic dysfunction. *Front Cell Neurosci* 9:1–11.
- Richardson-Jones JW, Craige CP, Nguyen TH, et al (2011) Serotonin-1A autoreceptors are necessary and sufficient for the normal formation of circuits underlying innate anxiety. *J Neurosci* 31:6008–6018.
- Risher WC, Eroglu C (2012) Thrombospondins as key regulators of synaptogenesis in the central nervous system. *Matrix Biol* 31:170–177.

- Rizzuto R, Brini M, Murgia M, Pozzan T (1993) Microdomains with High  $\text{Ca}^{2+}$  Close to  $\text{IP}_3$ -Sensitive Channels that Are Sensed by Neighboring Mitochondria. *Science* 262:744–747.
- Robbins TW, Arnsten AFT (2009) The Neuropsychopharmacology of Fronto-Executive Function: Monoaminergic Modulation. *Annu Rev Neurosci* 32:267–87.
- Roth BL (2016) DREADDs for Neuroscientists. *Neuron* 89:683–694.
- Roy A, Jong J, Linnoila M (1989) Cerebrospinal Fluid Monoamine Metabolites and Suicidal Behavior in Depressed Patients: A 5-Year Follow-up Study. *Arch Gen Psychiatry* 46:609–612.
- Rusakov DA (2015) Disentangling calcium-driven astrocyte physiology. *Nat Rev Neurosci* 16:226–233.
- Rush AJ, Trivedi MH, Wisniewski SR, et al (2006) Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: A STAR\*D report. *Am J Psychiatry* 163:1905–1917.
- Russo SJ, Nestler EJ (2013) The brain reward circuitry in mood disorders. *Nat Rev Neurosci* 14:609–625.
- Sachs BD, Ni JR, Caron MG (2015) Brain 5-HT deficiency increases stress vulnerability and impairs antidepressant responses following psychosocial stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:2557–2562.
- Sanacora G, Banasr M (2013) From Pathophysiology to Novel Antidepressant Drugs: Glial Contributions to the Pathology and Treatment of Mood Disorders. *Biol Psychiatry* 73:1172–1179.
- Sanacora G, Treccani G, Popoli M (2012) Towards a glutamate hypothesis of depression: An emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. *Neuropharmacology* 62:63–77.
- Sánchez-Bellot C, AlSubaie R, Mishchanchuk K, et al (2022) Two opposing hippocampus to prefrontal cortex pathways for the control of approach and avoidance behaviour. *Nat Commun* 13:1–17.
- Sandén N, Thorlin T, Blomstrand F, et al (2000) 5-Hydroxytryptamine<sub>2B</sub> receptors stimulate  $\text{Ca}^{2+}$  increases in cultured astrocytes from three different brain regions. *Neurochem Int* 36:427–434.
- Santana N, Bortolozzi A, Serrats J, et al (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.
- Santello M, Calì C, Bezzi P (2012) Gliotransmission and the tripartite synapse. *Adv Exp Med Biol* 970:307–331.
- Sargin D, Jeoung HS, Goodfellow NM, Lambe EK (2019) Serotonin Regulation of the Prefrontal Cortex: Cognitive Relevance and the Impact of Developmental Perturbation. *ACS Chem Neurosci* 10:3078–3093.
- Sasaki T, Beppu K, Tanaka KF, et al (2012) Application of an optogenetic byway for perturbing neuronal activity via glial photostimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:20720–20725.
- Savtchouk I, Volterra A (2018) Gliotransmission: Beyond Black-and-White. *J Neurosci* 38:14.
- Scemes E, Giaume C (2006) Astrocyte calcium waves: What they are and what they do. *Glia* 54:716–725.
- Schaefer HS, Putnam KM, Benca RM, Davidson RJ (2006) Event-related functional magnetic resonance imaging measures of neural activity to positive social stimuli in pre- and post-treatment depression. *Biol Psychiatry* 60:974–986.
- Schipke CG, Heuser I, Peters O (2011) Antidepressants act on glial cells: SSRIs and serotonin elicit astrocyte calcium signaling in the mouse prefrontal cortex. *J Psychiatr Res* 45:242–248.
- Schmitt LI, Wimmer RD, Nakajima M, et al (2017) Thalamic amplification of cortical connectivity sustains attentional control. *Nature* 545:219–223.

- Scofield MD, Boger HA, Smith RJ, et al (2015) Gq-DREADD selectively initiates glial glutamate release and inhibits cue-induced cocaine seeking. *Biol Psychiatry* 78:441–451.
- Seminowicz DA, Mayberg HS, McIntosh AR, et al (2004) Limbic–frontal circuitry in major depression: a path modeling metanalysis. *Neuroimage* 22:409–418.
- Semyanov A, Henneberger C, Agarwal A (2020) Making sense of astrocytic calcium signals — from acquisition to interpretation. *Nat Rev Neurosci* 21:551–564.
- Serrano A, Haddjeri N, Lacaille JC, Robitaille R (2006) GABAergic Network Activation of Glial Cells Underlies Hippocampal Heterosynaptic Depression. *J Neurosci* 26:5370–5382.
- Serrat R, Covelo A, Kouskoff V, et al (2021) Astroglial ER-mitochondria calcium transfer mediates endocannabinoid-dependent synaptic integration. *Cell Rep* 37:110133.
- Shah D, Gsell W, Wahis J, et al (2022) Astrocyte calcium dysfunction causes early network hyperactivity in Alzheimer’s disease. *Cell Rep* 40:111280.
- Shah PA, Park CJ, Shaughnessy MP, Cowles RA (2021) Serotonin as a Mitogen in the Gastrointestinal Tract: Revisiting a Familiar Molecule in a New Role. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 12:1093–1104.
- Shelton RC, Tollefson GD, Tohen M, et al (2001) A novel augmentation strategy for treating resistant major depression. *Am J Psychiatry* 158:131–134.
- Sheppard CA, Simpson PB, Sharp AH, et al (1997) Comparison of Type 2 Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Distribution and Subcellular Ca<sup>2+</sup> Release Sites that Support Ca<sup>2+</sup> Waves in Cultured Astrocytes. *J Neurochem* 68:2317–2327.
- Sherwood MW, Arizono M, Panatier A, et al (2021) Astrocytic IP3Rs: Beyond IP3R2. *Front Cell Neurosci* 15:695817.
- Shigetomi E, Bowser DN, Sofroniew MV, Khakh BS (2008) Two Forms of Astrocyte Calcium Excitability Have Distinct Effects on NMDA Receptor-Mediated Slow Inward Currents in Pyramidal Neurons. *J Neurosci* 28:6659–6663.
- Shigetomi E, Bushong EA, Haustein MD, et al (2013) Imaging calcium microdomains within entire astrocyte territories and endfeet with GCaMPs expressed using adeno-associated viruses. *J Gen Physiol* 141:633–647.
- Shigetomi E, Koizumi S (2023) The role of astrocytes in behaviors related to emotion and motivation. *Neurosci Res* 187:21–39.
- Shigetomi E, Patel S, Khakh BS (2016) Probing the Complexities of Astrocyte Calcium Signaling. *Trends Cell Biol* 26:300–312.
- Shigetomi E, Tong X, Kwan KY, et al (2011) TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. *Nat Neurosci* 15:70–80.
- Shrestha P, Mousa A, Heintz N (2015) Layer 2/3 pyramidal cells in the medial prefrontal cortex moderate stress induced depressive behaviors. *Elife* 4:e08752.
- Singh SK, Stogsdill JA, Pulimood NS, et al (2016) Astrocytes Assemble Thalamocortical Synapses by Bridging NRX1 $\alpha$  and NL1 via Hevin. *Cell* 164:183–196.
- Sirek A, Sirek OV (1970) Serotonin: a review. *Can Med Assoc J* 102:846-9.
- Sliz D, Hayley S (2012) Major depressive disorder and alterations in insular cortical activity: a review of current functional magnetic imaging research. *Front Hum Neurosci* 6:323.
- Sloman L (2008) A new comprehensive evolutionary model of depression and anxiety. *J Affect Disord* 106:219–228.

- Smith KS, Bucci DJ, Luikart BW, Mahler S V. (2016) DREADDs: Use and Application in Behavioral Neuroscience. *Behav Neurosci* 130:137-55.
- Smoski MJ, Felder J, Bizzell J, et al (2009) fMRI of alterations in reward selection, anticipation, and feedback in major depressive disorder. *J Affect Disord* 118:69–78.
- Sohur US, Padmanabhan HK, Kotchetkov IS, et al (2014) Anatomic and Molecular Development of Corticostriatal Projection Neurons in Mice. *Cereb Cortex* 24:293–303.
- Sontheimer H, Fernandez-Marques E, Ullrich N, et al (1994) Astrocyte Na<sup>+</sup> channels are required for maintenance of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity. *J Neurosci* 14:2464–2475.
- Spacek J, Harris KM (1998) Three-Dimensional Organization of Cell Adhesion Junctions at Synapses and Dendritic Spines in Area CA1 of the Rat Hippocampus. *J Comp Neurol* 393:58–68.
- Spear LP (2000) The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev* 24:417–463.
- Spellman T, Rigotti M, Ahmari SE, et al (2015) Hippocampal–prefrontal input supports spatial encoding in working memory. *Nature* 522:309–314.
- Srinivasan R, Huang BS, Venugopal S, et al (2015) Ca<sup>2+</sup> signaling in astrocytes from *Ip3r2*<sup>-/-</sup> mice in brain slices and during startle responses in vivo. *Nat Neurosci* 18:708–717.
- Stamatakis AM, Resendez SL, Chen KS, et al (2021) Miniature microscopes for manipulating and recording in vivo brain activity. *Microscopy* 70:399–414.
- Steger MF, Kashdan TB (2009) Depression and Everyday Social Activity, Belonging, and Well-Being. *J Couns Psychol* 56:289–300.
- Stephens MAC, Wand G (2012) Stress and the HPA Axis: Role of Glucocorticoids in Alcohol Dependence. *Alcohol Res* 34:468
- Stobart JL, Ferrari KD, Barrett MJP, et al (2018) Cortical Circuit Activity Evokes Rapid Astrocyte Calcium Signals on a Similar Timescale to Neurons. *Neuron* 98:726-735.e4.
- Streich L, Boffi JC, Wang L, et al (2021) High-resolution structural and functional deep brain imaging using adaptive optics three-photon microscopy. *Nat Methods* 18:1253–1258.
- Sun H, Neugebauer V (2011) mGluR1, but not mGluR5, activates feed-forward inhibition in the medial prefrontal cortex to impair decision making. *J Neurophysiol* 106:960–973.
- Sun JD, Liu Y, Yuan YH, et al (2012) Gap Junction Dysfunction in the Prefrontal Cortex Induces Depressive-Like Behaviors in Rats. *Neuropsychopharmacology* 37:1305–1320.
- Tan W, Ikoma Y, Takahashi Y, et al (2024) Anxiety control by astrocytes in the lateral habenula. *Neurosci Res* S0168-0102(24)00010-5.
- Tian Z, Yamanaka M, Bernabucci M, et al (2017) Characterization of serotonin-induced inhibition of excitatory synaptic transmission in the anterior cingulate cortex. *Mol Brain* 10:1–10.
- Ting JT, Daigle TL, Chen Q, Feng G (2014) Acute brain slice methods for adult and aging animals: application of targeted patch clamp analysis and optogenetics. *Methods Mol Biol* 1183:221–242.
- Tong X, Shigetomi E, Looger LL, Khakh BS (2013) Genetically Encoded Calcium Indicators and Astrocyte Calcium Microdomains. *Neuroscientist* 19:274–291.
- Torres-Platas SG, Hercher C, Davoli MA, et al (2011) Astrocytic Hypertrophy in Anterior Cingulate White Matter of Depressed Suicides. *Neuropsychopharmacology* 36:2650–2658.

- Tran FH, Spears SL, Ahn KJ, et al (2020) Does chronic systemic injection of the DREADD agonists clozapine-N-oxide or Compound 21 change behavior relevant to locomotion, exploration, anxiety, and depression in male non-DREADD-expressing mice? *Neurosci Lett* 739:135432.
- Tremblay R, Lee S, Rudy B (2016) GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. *Neuron* 91:260–292.
- Trivedi MH, Fava M, Wisniewski SR, et al (2006) Medication Augmentation after the Failure of SSRIs for Depression. *N Engl J Med* 354:1243–1252.
- Uekermann J, Channon S, Lehmkaemper C, et al (2008) Executive function, mentalizing and humor in major depression. *J Int Neuropsychol Soc* 14:55–62.
- Ueta Y, Sohn J, Agahari FA, et al (2019) Ipsi- and contralateral corticocortical projection-dependent subcircuits in layer 2 of the rat frontal cortex. *J Neurophysiol* 122:1461–1472.
- Underwood MD, Kassir SA, Bakalian MJ, et al (2018) Serotonin receptors and suicide, major depression, alcohol use disorder and reported early life adversity. *Transl Psychiatry* 8:279.
- Ung K, Tepe B, Pekarek B, et al (2020) Parallel astrocyte calcium signaling modulates olfactory bulb responses. *J Neurosci Res* 98:1605–1618.
- Unger EK, Keller JP, Altermatt M, et al (2020) Directed Evolution of a Selective and Sensitive Serotonin Sensor via Machine Learning. *Cell* 183:1986–2002.e26.
- Vaidyanathan TV, Collard M, Yokoyama S, et al (2021) Cortical astrocytes independently regulate sleep depth and duration via separate GPCR pathways. *Elife* 10:e63329.
- Vainchtein ID, Molofsky A V. (2020) Astrocytes and Microglia: In Sickness and in Health. *Trends Neurosci* 43:144–154.
- Vardy E, Robinson JE, Li C, et al (2015) A New DREADD Facilitates the Multiplexed Chemogenetic Interrogation of Behavior. *Neuron* 86:936–946.
- Veenit V, Cordero MI, Tzanoulinou S, Sandi C (2013) Increased corticosterone in peripubertal rats leads to long-lasting alterations in social exploration and aggression. *Front Behav Neurosci* 7:26.
- Venance L, Stella N, Glowinski J, Giaume C (1997) Mechanism Involved in Initiation and Propagation of Receptor-Induced Intercellular Calcium Signaling in Cultured Rat Astrocytes. *J Neurosci* 17:1981–1992.
- Ventura R, Harris KM (1999) Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J Neurosci* 19:6897–6906.
- Verkhratsky A, Butt A (2013) *Glial physiology and pathophysiology*. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- Verkhratsky A, Nedergaard M (2018) Physiology of astroglia. *Physiol Rev* 98:239–389.
- Verkhratsky A, Parpura V, Scuderi C, Li B (2021) Astroglial Serotonin Receptors as the Central Target of Classic Antidepressants. *Adv Neurobiol* 26:317.
- Vertes RP (1991) A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 313:643–668.
- Villalobos C, Beique JC, Gingrich JA, Andrade R (2005) Serotonergic regulation of calcium-activated potassium currents in rodent prefrontal cortex. *Eur J Neurosci* 22:1120–1126.
- Villanueva R (2013) Neurobiology of major depressive disorder. *Neural Plast* 2013:873278.
- Virchow R (1856) Über das granulirte Ansehen der Wandungen der Gerhirnventrikel. *Allg Z Psychiatr* 3:424–50.

- Virmani G, D'almeida P, Nandi A, Marathe S (2021) Subfield-specific effects of chronic mild unpredictable stress on hippocampal astrocytes. *Eur J Neurosci* 54:5730–5746.
- Volterra A, Liaudet N, Savtchouk I (2014) Astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signalling: an unexpected complexity. *Nat Rev Neurosci* 15:327–335.
- Wallraff A, Köhling R, Heinemann U, et al (2006) The Impact of Astrocytic Gap Junctional Coupling on Potassium Buffering in the Hippocampus. *J Neurosci* 26:5438–5447.
- Wang C, Furlong TM, Stratton PG, et al (2021a) Hippocampus–Prefrontal Coupling Regulates Recognition Memory for Novelty Discrimination. *J Neurosci* 41:9617–9632.
- Wang Q, Jie W, Liu JH, et al (2017) An astroglial basis of major depressive disorder? An overview. *Glia* 65:1227–1250.
- Wang Q, Kong Y, Wu DY, et al (2021b) Impaired calcium signaling in astrocytes modulates autism spectrum disorder-like behaviors in mice. *Nat Commun* 12:1–13.
- Wang X, Lou N, Xu Q, et al (2006) Astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  signaling evoked by sensory stimulation in vivo. *Nat Neurosci* 9:816–823.
- Wang Y, Delrosso NV (2019) Accurate quantification of astrocyte and neurotransmitter fluorescence dynamics for single-cell and population-level physiology. *Nat Neurosci* 22:1936–1944.
- Wang YB, Song NN, Ding YQ, Zhang L (2023) Neural plasticity and depression treatment. *IBRO Neurosci Rep* 14:160–184.
- Wang Z, Tymianski M, Jones OT, Nedergaard M (1997) Impact of Cytoplasmic Calcium Buffering on the Spatial and Temporal Characteristics of Intercellular Calcium Signals in Astrocytes. *J Neurosci* 17:7359–7371.
- Weigert C (1895) Beiträge zur Kenntnis der Normalen Menschlichen Neuroglia. Ärztlicher Verein, Germany.
- Weightman MJ, Air TM, Baune BT (2014) A review of the role of social cognition in major depressive disorder. *Front Psychiatry* 5:109043.
- Weisstaub N V., Zhou M, Lira A, et al (2006) Cortical 5-HT<sub>2A</sub> receptor signaling modulates anxiety-like behaviors in mice. *Science* 313:536–540.
- Westfall S, Caracci F, Estill M, et al (2021) Chronic Stress-Induced Depression and Anxiety Priming Modulated by Gut-Brain-Axis Immunity. *Front Immunol* 12:670500.
- Whissell PD, Tohyama S, Martin LJ (2016) The use of DREADDs to deconstruct behavior. *Front Genet* 7:70.
- Williams ES, Mazei-Robison M, Robison AJ (2022) Sex Differences in Major Depressive Disorder (MDD) and Preclinical Animal Models for the Study of Depression. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 14:a039198.
- Willins D, Deutch A, Roth B (1997) Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptors are expressed on pyramidal cells and interneurons in the rat cortex. *Synapse* 27:79–82
- Willner P (2016) The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiol Stress* 6:78–93.
- Wimmer RD, Schmitt LI, Davidson TJ, et al (2015) Thalamic control of sensory selection in divided attention. *Nature* 526:705.
- Wiśłowska-Stanek A, Kołosowska K, Maciejak P, Faron-Górecka A (2021) Neurobiological Basis of Increased Risk for Suicidal Behaviour. *Cells* 10:2519.



- Wong DT, Perry KW, Bymaster FP (2005) Case History: The Discovery of Fluoxetine Hydrochloride (Prozac). *Nat Rev Drug Discov* 4:764–774.
- Woolley DW, Shaw E (1954) A BIOCHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL SUGGESTION ABOUT CERTAIN MENTAL DISORDERS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 40:228–231.
- World Health Organization (2023) Depressive disorder (depression). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>. Accessed 12 Feb 2024
- World Health Organization (2012) WHO. Global burden of mental disorders and the need for a comprehensive, coordinated response from health and social sectors at the country level. [http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/EB130/B130\\_R8-en.pdf](http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB130/B130_R8-en.pdf). Accessed 7 Feb 2024
- Wu C, Singh SK, Dias P, et al (1999) Activated Astrocytes Display Increased 5-HT<sub>2a</sub> Receptor Expression in Pathological States. *Exp Neurol* 158:529–533.
- Xie X hui, Lai W tao, Xu S xian, et al (2022) Hyper-inflammation of astrocytes in patients of major depressive disorder: Evidence from serum astrocyte-derived extracellular vesicles. *Brain Behav Immun* 109:51–62.
- Xie Y, Wang T, Sun GY, Ding S (2010) Specific disruption of astrocytic Ca<sup>2+</sup> signaling pathway in vivo by adeno-associated viral transduction. *Neuroscience* 170:992–1003.
- Yan Z, Rein B (2021) Mechanisms of synaptic transmission dysregulation in the prefrontal cortex: pathophysiological implications. *Mol Psychiatry* 27:445–465.
- Yang M, Silverman JL, Crawley JN (2011) Automated three-chambered social approach task for mice. *Curr Protoc Neurosci* 8:8.26.
- Yang SS, Mack NR, Shu Y, Gao WJ (2021) Prefrontal GABAergic Interneurons Gate Long-Range Afferents to Regulate Prefrontal Cortex-Associated Complex Behaviors. *Front Neural Circuits* 15:716408.
- Yildiz-Yesiloglu A, Ankerst DP (2006) Review of 1H magnetic resonance spectroscopy findings in major depressive disorder: A meta-analysis. *Psychiatry Res Neuroimaging* 147:1–25.
- Yohn CN, Gergues MM, Samuels BA (2017) The role of 5-HT receptors in depression. *Mol Brain* 10:1–12.
- Yoon BE, Lee CJ (2014) GABA as a rising gliotransmitter. *Front Neural Circuits* 8:115769.
- Yoon S, Kim JE, Hwang J, et al (2016) Effects of Creatine Monohydrate Augmentation on Brain Metabolic and Network Outcome Measures in Women With Major Depressive Disorder. *Biol Psychiatry* 80:439–447.
- Young SN, Leyton M (2002) The role of serotonin in human mood and social interaction: Insight from altered tryptophan levels. *Pharmacol Biochem Behav* 71:857–865.
- Yu G, Cao F, Hou T, et al (2022) Astrocyte reactivation in medial prefrontal cortex contributes to obesity-promoted depressive-like behaviors. *J Neuroinflammation* 19:1–18.
- Yu GL, Zhang Y, Ning B (2021) Reactive Astrocytes in Central Nervous System Injury: Subgroup and Potential Therapy. *Front Cell Neurosci* 15:792764.
- Yu X, Nagai J, Khakh BS (2020) Improved tools to study astrocytes. *Nat Rev Neurosci* 21:121–138.
- Yu X, Taylor AMW, Nagai J, et al (2018) Reducing Astrocyte Calcium Signaling In Vivo Alters Striatal Microcircuits and Causes Repetitive Behavior. *Neuron* 99:1170–1187.e9.
- Zaniewska M, McCreary AC, Wydra K, Filip M (2010) Effects of serotonin (5-HT)<sub>2</sub> receptor ligands on depression-like behavior during nicotine withdrawal. *Neuropharmacology* 58:1140–1146.
- Zhang G, Stackman RW (2015) The role of serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptors in memory and cognition. *Front Pharmacol* 6:19.

- Zhang H, Zhao Y, Wang Z (2015) Chronic corticosterone exposure reduces hippocampal astrocyte structural plasticity and induces hippocampal atrophy in mice. *Neurosci Lett* 592:76–81.
- Zhang Y, Chen K, Sloan SA, et al (2014) An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex. *J Neurosci* 34:11929–11947.
- Zhao S, Xu X, Xie G, Zhang T (2022) Chronic corticosterone exposure impairs emotional regulation and cognitive function through disturbing neural oscillations in mice. *Behav Brain Res* 434:114030.
- Zhao Y, Lin Z, Chen L, et al (2018) Hippocampal astrocyte atrophy in a mouse depression model induced by corticosterone is reversed by fluoxetine instead of benzodiazepine diazepam. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 83:99–109.
- Zheng K, Bard L, Reynolds JP, et al (2015) Time-Resolved Imaging Reveals Heterogeneous Landscapes of Nanomolar  $\text{Ca}^{2+}$  in Neurons and Astroglia. *Neuron* 88:277–288.
- Zhong P, Liu W, Gu Z, Yan Z (2008a) Serotonin facilitates long-term depression induction in prefrontal cortex via p38 MAPK/Rab5-mediated enhancement of AMPA receptor internalization. *J Physiol* 586:4465–4479.
- Zhong P, Yuen EY, Yan Z (2008b) Modulation of Neuronal Excitability by Serotonin-NMDA Interactions in Prefrontal Cortex. *Mol Cell Neurosci* 38:290–299.
- Zhou B, Zuo YX, Jiang RT (2019) Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases. *CNS Neurosci Ther* 25:665–673.
- Zolnik TA, Ledderose J, Toumazou M, et al (2020) Layer 6b Is Driven by Intracortical Long-Range Projection Neurons. *Cell Rep* 30:3492–3505.e5.
- Zong W, Obenhaus HA, Skytøen ER, et al (2022) Large-scale two-photon calcium imaging in freely moving mice. *Cell* 185:1240–1256.e30.
- Zorec R, Araque A, Carmignoto G, et al (2012) Astroglial excitability and gliotransmission: an appraisal of  $\text{Ca}^{2+}$  as a signalling route. *ASN Neuro* 4:103–119.

## A. Publicaciones

A.1. Dysfunctional serotonergic neuron-astrocyte signaling in depressive-like states



## ARTICLE OPEN



# Dysfunctional serotonergic neuron-astrocyte signaling in depressive-like states

Candela González-Arias<sup>1,2</sup>, Andrea Sánchez-Ruiz<sup>1,2</sup>, Julio Esparza<sup>1</sup>, Cristina Sánchez-Puelles<sup>1,3</sup>, Lucia Arancibia<sup>1</sup>, Jorge Ramírez-Franco<sup>1,4</sup>, Davide Gobbo<sup>5</sup>, Frank Kirchhoff<sup>1,5</sup> and Gertrudis Perea<sup>1</sup>✉

© The Author(s) 2023

Astrocytes play crucial roles in brain homeostasis and are regulatory elements of neuronal and synaptic physiology. Astrocytic alterations have been found in Major Depressive Disorder (MDD) patients; however, the consequences of astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in MDD are poorly understood. Here, we found that corticosterone-treated juvenile mice (Cort-mice) showed altered astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics in mPFC both in resting conditions and during social interactions, in line with altered mice behavior. Additionally, Cort-mice displayed reduced serotonin (5-HT)-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in mPFC astrocytes, and aberrant 5-HT-driven synaptic plasticity in layer 2/3 mPFC neurons. Downregulation of astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in naïve animals mimicked the synaptic deficits found in Cort-mice. Remarkably, boosting astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signaling with Gq-DREADDS restored to the control levels mood and cognitive abilities in Cort-mice. This study highlights the important role of astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signaling for homeostatic control of brain circuits and behavior, but also reveals its potential therapeutic value for depressive-like states.

*Molecular Psychiatry*; <https://doi.org/10.1038/s41380-023-02269-8>

## INTRODUCTION

Astrocytes have emerged as active modulatory cells in synaptic transmission and plasticity [1, 2]. By sensing synaptic activity through  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent [3] and independent [4] mechanisms, astrocytes respond to different neurotransmitters triggering a wide range of cellular responses, including the release of active substances, so-called gliotransmitters [5]. These gliotransmitters have been found to regulate neuronal excitability and synaptic physiology [6], impacting brain activity and animal behavior [7]. Recent evidence has shown the crucial role that astrocytic activity plays in complex behaviors, from motor [8] and sensory processing [9], to cognitive [10] and emotional responses [11]. Such broad range of astrocyte functions indicates their ability to adjust their physiology to continuously meet the varying demands of neural activity [12]. Indeed, astrocytes are highly sensitive to brain stressors, undergoing functional and structural changes, which emphasizes their role in neurological and psychiatric diseases [13].

Stress stimulates the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and the secretion of stress hormones, that is, cortisol in humans [14] and corticosterone in murine animals [15], which act on glucocorticoid receptors. Astrocytes are enriched in glucocorticoid receptors [16] making them an ideal target for corticosterone actions. In fact, acute and chronic stress exposure induces significant alterations in astrocyte physiology, including alterations in connexins expression, glutamate uptake, glucose metabolism or purinergic signaling among others [16–19]. Chronic stress is one of the main factors related with Major Depressive Disorder (MDD) [15, 20–22], a severe mental illness leading to cognitive

impairments and psychosocial alterations. In addition to the reported decreased social interaction and impaired emotional information processing [23], MDD is associated with alterations in attention, executive functions and learning and memory processes [24]. In particular, stressful events during childhood and adolescence have critical impact in brain maturation, and are related to later social and emotional maladjusted behaviors, including depressive-disorders [25, 26]. In animal research, different chronic stress protocols are commonly used to study anxiety and depressive phenotypes [27, 28], including a corticosterone treatment [29–31], allowing to evaluate the therapeutical value of antidepressants [32, 33]. Currently, the main drugs to treat depression target the serotonergic system, increasing serotonin (5-HT) availability in the synaptic cleft as a common effect [34], supporting the monoaminergic hypothesis of depression [35]. Although other therapeutic strategies have been developed as antidepressant drugs targeting the glutamatergic system, AMPA and NMDA receptors [36, 37]; GABAergic system, GABA<sub>A</sub> receptors [38]; glucocorticoids receptors [39]; 5-HT receptors [40] and dopamine receptors D2 [41]. The currently available treatments are only effective in half of MDD patients, revealing the complex heterogeneous nature of the disorder, which possibly involves multiple etiologies [42]. Therefore, fully understanding the multi-sided mechanism responsible for the development of depression is crucial to develop new therapeutic strategies.

To add complexity, postmortem analyses of MDD patients have shown reductions of astrocytic densities in multiple brain areas [43, 44]. Moreover, S100 $\beta$ , a calcium binding protein mainly found in astrocytes, was elevated in the serum of MDD patients [45],

<sup>1</sup>Cajal Institute, CSIC, 28002 Madrid, Spain. <sup>2</sup>PhD Program in Neuroscience, Autonomía de Madrid University-Cajal Institute, Madrid 28029, Spain. <sup>3</sup>Tetraneuron, 46005 Valencia, Spain. <sup>4</sup>Institut de Neurosciences de la Timone, Aix-Marseille Université (AMU) & CNRS, UMR7289, 13005 Marseille, France. <sup>5</sup>Molecular Physiology, Center for Integrative Physiology and Molecular Medicine, University of Saarland, 66421 Homburg, Germany. ✉email: [gperea@cajal.csic.es](mailto:gperea@cajal.csic.es)

Received: 9 December 2022 Revised: 11 September 2023 Accepted: 12 September 2023

Published online: 29 September 2023

indicating that astrocytes may be relevant actors in the pathogenesis of MDD [46]. In this line, studies performed in animal models showed that experimental manipulations to reduce astrocyte densities in medial prefrontal cortex (mPFC) induced depressive-like phenotypes [47]. Furthermore, the pharmacological blockade of connexins, glutamate uptake, or  $K^+$  homeostasis alterations induced depressive-like behaviors [18, 48–50]. Reduced levels of ATP in the extracellular space from neuronal or astrocyte sources have also been related to the pathophysiology of MDD [51]. Altogether, these evidences indicate that astrocytes contribute to MDD through different molecular pathways. Nevertheless, little is known about how this pathological brain state impacts astrocyte  $Ca^{2+}$  signaling, a key intracellular regulator of astrocyte physiology, both in resting and in response to neuronal demands [17].

Here, we investigated the astrocyte  $Ca^{2+}$  dynamics and 5-HT-driven astrocyte-neuron signaling in a chronic corticosterone mouse model of stress, Cort-mice, that recapitulates depressive-like behaviors [29–31, 33]. We have focused on mPFC, a critical hub for executive function and emotion regulation, which is a target for stress hormones, and it has been found implicated in many stress-influenced psychological disorders, including MDD [52, 53]. In juvenile-treated mice, we found abnormal in vivo astrocyte  $Ca^{2+}$  signaling in mPFC in Cort-mice, which was largely impaired during social interactions. Ex vivo recordings in mPFC slices confirmed the dysfunctional astrocytic signaling in depressive-like states, with enhanced oscillatory activity but reduced amplitude of  $Ca^{2+}$  events in Cort-mice, and diminished 5-HT-engaged astrocytic  $Ca^{2+}$  activity. Additionally, Cort-mice showed an altered 5-HT-driven synaptic plasticity in layer 2/3 mPFC excitatory neurons, that was replicated by downregulating astrocyte  $Ca^{2+}$  signaling in control mice. Remarkably, the cognitive and mood abilities altered in Cort-mice were restored to normal by selective chemogenetic (Gq-DREADDS) manipulation of astrocyte  $Ca^{2+}$  signaling in vivo. By contrast, significant behavioral impairments were found in naïve mice after chemogenetic astrocyte activation, revealing that the subtle control of astrocyte  $Ca^{2+}$  signaling is crucial for the proper function of mPFC in health and disease. Altogether, this study shows the prominent role of astrocytes for the serotonergic system and highlights the potential of astrocytic intracellular  $Ca^{2+}$  modulation as a therapeutic target for depressive-like states.

## METHODS

### Experimental subjects

All the procedures for handling and sacrificing animals followed the European Commission guidelines for the welfare of experimental animals (2010/63/EU) and were approved by the local Bioethics Committee (2013/53/RD). Animals were housed in standard laboratory cages with *ad libitum* access to food and water, under a 12-hour dark–light cycle in temperature-controlled rooms. Male C57BL/6 wild-type mice, *Ip3r2*<sup>−/−</sup> (RRID: MGI:3640970), and *Aldh1l1*-EGFP mice (RRID: MMRRC\_011015-UCD) were used in the present study from 1–3 months old. Mice studied for longitudinal analysis of corticosterone treatment effects (Extended data Fig. 1a, b) were 5 months old. C57BL/6 mice were purchased from Jackson Laboratory. *Ip3r2*<sup>−/−</sup> mice were generated by crossing germline-heterozygous-null mutant *Ip3r2*<sup>+/-</sup> mice [54].

### Corticosterone treatment

Corticosterone (Cort, Cat# C2505; Sigma-Aldrich) was dissolved in commercial mineral water [55]. Decreasing Cort concentrations were presented to male C57BL/6 wild-type mice for 28 days: 30 µg/ml during 15 days (resulting in a dose of approximately 6.6 mg/kg/day), followed by 15 µg/ml (2.7 mg/kg/day) during 3 days, and 7.5 µg/ml (1.1 mg/kg/day) during 10 days; for a gradual recovery of endogenous corticosterone plasma levels [33, 55]. Cort solution was available *ad libitum* in drinking water (dark bottles) and was renewed every 72 h. To verify Cort consumption, bottles' weight was controlled each time the solution was

renewed. Control mice (naïve) followed the same experimental approach without Cort in their bottles. At the end of the treatment, mice from both groups were subjected to behavioral tests. Cort treatment started at P30. Forced swimming test (FST) was routinely evaluated to highlight the level of animal despair in order to guarantee the existence of a reliable mouse model of depression [33, 55]. In a subset of mice, long-term effects of Cort treatment were analyzed after 3 months (Extended Data Fig. 1a). After two weeks of treatment, naïve and Cort-mice were injected with viral vectors. Mice were randomly distributed in naïve and Cort-group before the treatment, and animal weight distribution was equally represented in both groups.

### Corticosterone measurements

Glucocorticoids deposited in hair have been identified as a biomarker-based stress assessment (cf. [56]). Corticosterone (Cort) was measured in hair and serum samples. Both samples were collected before the start of the treatment and 1- and 90-days post Cort treatment. Hair samples were obtained in anesthetized mice by shaving dorsal midline using an electric razor and stored at 4 °C. Hair samples were washed three times with isopropanol and gently mix followed by decanting excess isopropanol, and allowed to dry for 48 h. Dried hair samples were transferred to 2 mL polypropylene tubes containing 2 steel ball to ground to a fine powder at 30 Hz for 30 min. In total, 50 mg of ground powdered hair samples were placed in centrifuge tube containing 1 mL of methanol and kept on rotation overnight at room temperature (RT). Samples were centrifuged at 4000 rpm for 10 min, at 25 °C and 0.5 mL of the steroid-containing methanol supernatant was transferred to a new polypropylene tube and evaporated during 1 h at 30 °C. The dried extracts were reconstituted in 100 µL of Assay buffer provided in the corticosterone enzyme immunoassay kit.

Blood samples were collected by cardiocentesis after euthanasia by CO<sub>2</sub> overdose between 09:00–10:00 am. Blood was centrifuged at 9000 × *g* for 10 min at 4 °C, and serum was separated and stored at −80 °C until analysis.

Corticosterone levels in hair and serum samples were quantified using a commercially available enzyme immunoassay kit (DetectX® Corticosterone Enzyme Immunoassay Kit K014-H5 Arbor Assays). Samples were analysed in duplicate according to the manufacturer's instructions.

### Surgeries and viral injections

Mice (1–2 months) were anesthetized via isoflurane (5% for induction, 2% for maintenance) in oxygen and place in a custom adapted stereotaxic frame. Depth of anesthesia was determined by testing toe-pinch reflexes. Body temperature was continuously monitored and maintained at 37 °C. Buprenorphine (0.1 mg/kg; Buprenex, 0.1 mg/ml) was subcutaneously injected before surgeries. The hair of the scalp was shaved and cleaned with 70% ethanol. Once bregma and lambda were exposed, target coordinates were taken from Paxinos atlas [57]. Medial prefrontal cortex (mPFC) coordinates: 1.78 mm anterior, ±0.3 mm lateral from bregma, and from 2.5 to 0.8 dorso-ventral; Dorsal raphe nucleus (DRN) coordinates: posterior coordinate was scaled using bregma-lambda distance × 0.98 for every mouse [58], 1.1 mm lateral from lambda, and from 3.3 to 2.8 dorso-ventral, 20° angle. A craniotomy was made at the injection site using a small burr (Ref. 19007-05, Fine Science Tools), powered by a surgical drill (NSK V-Max Volvere Lab System). Saline solution (0.9%) was applied to keep the skull cold and to maintain hydration. Intracranial injections were made using a borosilicate micropipette (World Precision Instruments) at 50 nl/min infusion rate. The following viral vectors were used: AAV5-gfaABC1D-cyto-GCaMP6f (Addgene 52925; viral titer  $1.3 \times 10^{13}$  GC/ml), AAV5-GFAP-hM3Dq-mCherry (Addgene 50478; viral titer  $2 \times 10^{13}$  GC/ml), AAV8-GFAP104-mCherry (UNC Vector Core; viral titer  $2.7 \times 10^{12}$  GC/ml), AAV9-hSyn-ChrimsonR-tdTom (UNC Vector Core; viral titer  $4.1 \times 10^{12}$  GC/ml), AAV5-GFAP-mcherry-cre (UNC Vector Core; viral titer  $4.3 \times 10^{12}$  GC/ml), AAV5-CAG-flex-iSeroSnFR (Addgene 128486; viral titer  $5 \times 10^{12}$  GC/ml, Unitat de Vectors Virals, UAB), AAV5-GFAP-eGFP-WPRE-hGH (Addgene 105549; viral titer  $1.3 \times 10^{13}$  GC/ml), AAV9-CaMKIIa-eYFP (Penn Vector Core, viral titer  $2.55 \times 10^{12}$  GC/ml). After injection, the micropipette was held in place for 5 min prior to retraction to prevent leakage. The skin was sutured and the mice were monitored, kept on a heating pad while recovering and returned to the home cage. Buprenorphine (0.05 ml, 0.1 mg/ml), was given once daily for 48 h post-surgery. Experiments were performed 2–3 weeks post-injection. Viral injections were performed bilaterally, but for in vivo recordings involving cannula implantations only the right hemisphere was selected.

### Cortical slice preparation

Animals were sacrificed and their brains were quickly and carefully removed [59]. The brains were placed in an ice-cold artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing [in mM]: NaCl 124, KCl 2.69,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.25,  $\text{MgSO}_4$  2,  $\text{NaHCO}_3$  26,  $\text{CaCl}_2$  2, and glucose 10, and was gassed with carbogen (95%  $\text{O}_2$ /5%  $\text{CO}_2$ , pH = 7.3). Slices 350  $\mu\text{m}$  thick were obtained with a vibratome (Leica Vibratome VT1200S, Germany) and incubated (>1 h) at RT (22–24 °C) in aCSF continuously bubbled. Slices were then transferred to an immersion recording chamber superfused at 2 ml/min with gassed aCSF and visualized under an Olympus BX50WI microscope (Olympus Optical, Japan) coupled with a 40x water immersion lens and infrared-DIC optics.

To improve slice viability in adult mice (>2 months old), ice-cold (4 °C) NMDG-HEPES solution was perfused prior to brain extraction. Subsequently, slices were placed in the same NMDG-HEPES solution at 37 °C for 10 min. Afterwards, slices were kept in aCSF until use (>1 h). NMDG-HEPES contained the following [in mM]: NMDG 92, KCl 2.5,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1.2,  $\text{NaHCO}_3$  30, HEPES 20, glucose 25, thiourea 2, Na-ascorbate 5, Na-pyruvate 3,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.5, and  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10 (95%  $\text{O}_2$ /5%  $\text{CO}_2$ , pH = 7.3) [60]. A modified  $\text{Mg}^{2+}$ -free aCSF was used to monitor slow inward currents (SICs) in order to optimize NMDA receptor activation, which contained the following [in mM]: NaCl 124, KCl 2.69,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.25,  $\text{NaHCO}_3$  26, glucose 10,  $\text{CaCl}_2$  4 and glycine 0.01 (95%  $\text{O}_2$ /5%  $\text{CO}_2$ , pH = 7.3).

### Ex vivo calcium imaging and analysis

The genetically encoded calcium indicator (GECIs) AAV5-GFAP-cytoGCaMP6f was bilaterally injected in mPFC, and after 2–3 weeks astrocytes from cortical slices were analyzed. Astrocytes of mPFC layer 2/3 were imaged using a CCD camera (ORCA-235, Hamamatsu, Japan) attached to the microscope. Cells were illuminated for 100–200 ms at 490 nm using LED system (CoolLED pE-100), and images were acquired at 1 Hz during 2 min. The LED system and the camera were controlled and synchronized by NIS Elements software (Nikon, Japan). Spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  events were monitored during 2 min in presence of TTX; and  $\text{Ca}^{2+}$  evoked responses were analyzed by recording baseline activity for 30 s, followed by local application of 5-HT (1 mM; 10 s, 1 bar), ATP (1 mM; 10 s, 1 bar), and clozapine-N-oxide (CNO, 1 mM; 2 s, 1 bar) restricted to 60 s after stimuli. Local application of agonists was delivered by pressure pulses through a micropipette (Picospritzer II, Parker Hannifin, Mayfield Heights, OH, USA). To isolate the specific response of astrocytes to 5-HT, the following drug cocktail was included in aCSF: TTX 1  $\mu\text{M}$ , picrotoxin 50  $\mu\text{M}$ , AM251 2  $\mu\text{M}$ , MRS 2179 10  $\mu\text{M}$ , CGP 55845 5  $\mu\text{M}$ , LY367385 100  $\mu\text{M}$ . For ATP experiments, MRS 2179 was excluded from the cocktail. For CNO experiments, TTX was added to the aCSF. For the experiments combining  $\text{Ca}^{2+}$  imaging and optogenetic stimulation, baseline recordings were acquired for 60 s, and astrocyte-evoked responses were considered up to 60 s after DRN fibers stimulation.

Regions of interest (ROI) were manually selected using ImageJ software. All pixels within each ROI were averaged to obtain a single time course  $F[t]$  per ROI. Custom-written software in MATLAB (MATLAB R2020a; Mathworks, Natick, MA) was used for further processing (modified from Mederos et al., 2020). Artifacts in the fluorescence signal produced by mechanical movement were removed from the analysis. Then, signals were low-pass filtered with a Chebyshev II filter. Photobleaching was adjusted and the  $\Delta F/F_0$  was calculated for each ROI. Events were considered when their  $\Delta F/F_0 > 2.3$  times the noise variance and had at least > 3% of relative change (0.03). Frequency, amplitude, area under the curve, and duration were analyzed for each ROI. In a subset of experiments (Extended Data Fig. 2a, b and Extended Data Fig. 3e, f), mPFC slices were incubated with Fluo-4 AM (1  $\mu\text{l}$  of 2 mM dye was dropped over the mPFC, attaining a final concentration of 2–10  $\mu\text{M}$ ) dissolved in 0.02% pluronic and 0.04% DMSO for 15–20 min at RT, and  $\text{Ca}^{2+}$  signal analysis was restricted to the cell soma (cf. [61]).

### In vivo calcium recordings and analysis

AAV5-GFAP-cytoGCaMP6f was injected in the right hemisphere of mPFC, followed by implantation of 2 mm borosilicate fiber-optic cannulas (fiber core  $\varnothing$  of 400  $\mu\text{m}$ ; 0.66 NA; ref. MFC\_400/430-0.66\_2.0\_MF1.25\_FLT, Doric Lenses). Cannulas were secured to the skull using a base layer of adhesive dental cement (Meron, Voco). 2–3 weeks after the surgery, behavioral testing started to allow for viral expression and animal recovery.

Doric GCaMP Fiber Photometry System (FPS\_15\_GCaMP, Doric Lenses) was used, with a 405 nm LED as the isosbestic point, and a 465 nm LED as the excitation dependent GCaMP fluorescence. Blue light was delivered to the brain at 20–50  $\mu\text{W}$ . Signals were interleaved and collected at 100 Hz. Raw signals were demodulated and analyzed with custom-written software

in MATLAB, with a cut-off frequency of 20 Hz and an attenuation of 20 dB, followed by a 1 s moving mean window. Isosbestic signals were fitted to  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent signals and subtracted to eliminate motion related artifacts [62, 63]. GCaMP6 fluorescence signals across animals were standardized as follows:  $\Delta F = (F - F_0)/F_0$ , where  $F_0$  was computed by linearly interpolating between the local minima of the fluorescence signal across different time windows (window size: 45 s) to account for any remaining photobleaching.  $\text{Ca}^{2+}$  event was defined as a period in which fluorescence showed a local maximum >2 times the noise variance of the signal [64]. Events whose maximum value was below 0.01 (1% of relative change), or whose prominence were below 0.001 (0.1%) were excluded. Events were expanded towards the closest local minima (both before and after the peak), to designate the start and end of putative  $\text{Ca}^{2+}$  events. To account for multipeak events, Gaussians were fitted to each  $\text{Ca}^{2+}$  event to infer their real duration and area under the curve.

For behavioral testing, spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  signals were analyzed in the open field test (OF), and mice showing <2 events in OF were removed from the analysis. Spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  events detected during the first 5 min were selected and analyzed. For social recognition test, analysis was restricted to the first 5 explorations for both the neutral object and unfamiliar mouse, to avoid the exponential decay shown after several explorations [65]. To analyze  $\text{Ca}^{2+}$  events during explorations, events whose peak occurred in the interval defined from 1 s before exploration onset up to 3 seconds after the end of an exploration were selected. To compare across subjects, signals were Z-score transformed, by computing the ratio of the  $\Delta F/F_0$  signal over the standard deviation of the signal during the first 5 min when mice were in the neutral chamber [66].  $\text{Ca}^{2+}$  signals were time-aligned from 5 s prior to exploration onset up to 20 s after exploration onset (Fig. 1h). Animal speed was evaluated to discard any possible confounding between astrocytic activity and mouse running speed. For the open field, the mean velocity during the entire duration of each  $\text{Ca}^{2+}$  event was computed. Then, a linear regression model linking  $\text{Ca}^{2+}$  event amplitude and mean velocity was fitted using the fitlm function in MATLAB. For the social recognition test, the mean speed associated to each  $\text{Ca}^{2+}$  event was computed as described above, and only events associated to the first 5 explorations (object and mouse) were considered for downstream analysis. Then, a linear regression was fitted separately for  $\text{Ca}^{2+}$  events associated to object explorations and for events associated to mouse exploration.

### In vivo serotonergic recordings and analysis

Mice were injected with either AAV5-CAG-flex-iSeroSnFR + AAV5/GFAP-mcherry-cre, or AAV5-GFAP-eGFP-WPRE-hGH virus in the right hemisphere of mPFC, followed by implantation of fiber-optic cannula (fiber core  $\varnothing$  of 400  $\mu\text{m}$ ; 0.50 NA; ref. FP400URT Thorlabs) following the same surgical procedure as for GCaMP Fiber Photometry. In addition, AAV9-hSyn-ChrimsonR-tdTom was injected in DRN, and fiber-optic cannula implanted (fiber core  $\varnothing$  of 400  $\mu\text{m}$ ; 0.50 NA; ref. FP400URT, Thorlabs). In total, 2–3 weeks after surgery, behavioral testing started to allow for viral expression and animal recovery. Fiber photometry recordings were performed using FPS\_15\_GCaMP system. A 465 nm LED delivered at 70–130  $\mu\text{W}$  was used for iSeroSnFR excitation, and a 590 nm LED (M590F3 - 590 nm, Fiber-Coupled LED, 1000 mA, SMA- LEDD1B - T-Cube LED Driver) at 5 mW was used for optogenetic stimulation of DRN. iSeroSnFR and eGFP signals were recorded while the mouse was freely moving in the OF arena. Each animal underwent between 2 and 6 trials of DRN stimuli (40 Hz, 10 s) with 50 s inter-intervals, with 3 min of baseline recordings previous to DRN stimulation. For the analysis, the first min of recordings was discarded to account for signal photobleaching effects. Photometry signals were collected interleaved at a sampling frequency of 50 Hz and analyzed as described above. Signals were low-pass filtered with a Chebyshev Type II filter with a 30 Hz cut-off frequency.  $\Delta F/F_0$  signal was computed for iSeroSnFR and eGFP fluorescence measurements. For traces representation (Extended Data Fig. 5e, g), signals were low-pass filtered with a cut-off frequency of 20 Hz to reduce noise, and Z-score was computed to compare across subjects. Analysis was restricted to the signals recorded 30 s before (baseline) and the 30 s after the stimulation onset.

### Ex vivo electrophysiological recordings

Whole-cell patch-clamp recordings from layer 2/3 pyramidal neurons and astrocytes of mPFC were performed. Neuronal currents were recorded by borosilicate capillaries (3–6 M $\Omega$ ) filled with an intracellular solution that contained [in mM]: K-gluconate 135, KCl 10, HEPES 10,  $\text{MgCl}_2$  1, and ATP- $\text{Na}_2$



2 (pH = 7.3). In some experiments, intracellular solution was modified containing GDP $\beta$ S 2 mM. Astrocytic whole-cell recordings were performed (8–10 M $\Omega$ ) using an intracellular solution containing [in mM]: BAPTA-K<sub>4</sub> 40, NaCl 8, MgCl<sub>2</sub> 1, HEPES 10, GTP-tris salt 0.4 and ATP-Na<sub>2</sub> 2 (pH = 7.3). Astrocyte recordings lasted  $\geq$  30 min to allow the dialysis of BAPTA through the gap-junction connected astrocytic network [67]. Recordings were obtained with PC-ONE amplifiers (Dagan Corporation, Minneapolis, MN) in voltage-clamp conditions and the membrane potential was held at  $-70$  mV. Series and input resistances were monitored throughout the experiment using  $-5$  mV pulses. Recordings with access resistance change  $>20\%$  were rejected. Signals were fed to a Pentium-based PC through a DigiData 1440 interface board (Axon Instruments). Signals were filtered at 1 kHz and acquired at 10 kHz sampling rate. The pCLAMP 10.7 software (Axon Instruments) was used for stimulus generation, data display, acquisition, and storage. Experiments were performed at RT.

Slow inward currents (SICs) were recorded in the presence of TTX (1  $\mu$ M) and distinguished from miniature synaptic currents (mEPSCs) by their slower time courses [68, 69]. SICs were abolished by the presence of AP5, a selective antagonist of NMDARs (50  $\mu$ M;  $0.27 \pm 0.04$ ,  $n = 35$  in control vs  $0.05 \pm 0.02$ ,  $n = 13$  in AP5; One Way ANOVA, Dunn's Method,  $P < 0.001$ . Source data) [68]. Excitatory postsynaptic currents (EPSC) were elicited by theta capillaries (2–5  $\mu$ m tip diameter) located in layer V and filled with aCSF. Paired pulses (250  $\mu$ s duration; 75 ms interval) were continuously delivered at 0.33 Hz by stimulator S-900 (Dagan Corporation). Baseline of synaptic activity was measured 5 min before local application of 5-HT/CNO. aCSF included picrotoxin (50  $\mu$ M) to block GABA<sub>A</sub>-dependent inhibitory synaptic activity. For the analysis, neuronal recordings that did not show stable responses were discarded. Recordings that did not last  $>25$  min were excluded from the delayed responses quantification, but considered for short responses analysis.

To monitor depolarization or hyperpolarization of neuronal membranes induced by puff application, changes in holding current (HC) were recorded and computed as HC index:  $[HC(i) - HC(\text{baseline})]/\text{absolute value } [HC(i) + HC(\text{baseline})]$ .  $i = \text{HC value at different time points after puff application, baseline} = \text{mean HC before puff application}$ .

### Optogenetic stimulation

Light stimulation with the CoolLED illumination system, 550 nm light pulses of 50 ms at 5 Hz (1 mW) was applied for the electrophysiological recordings in mPFC slices, which activated ChrimsonR-expressing fibers and induced the endogenous release of 5-HT. For ex vivo astrocyte Ca<sup>2+</sup> recordings, 640–660 nm light stimulation (10 s, continuous light,  $<1$  mW) through external laser was used to activate ChrimsonR-expressing fibers.

### Immunohistochemistry and confocal microscopy

Mice were euthanized by sodium pentobarbital i.p. injections and transcardially perfused with phosphate-buffered saline (PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4; 15714 Electron Microscopy Sciences, EM Grade) followed by ice-cold 4% paraformaldehyde (PFA). Brains were removed and postfixed overnight (o/n) at 4 °C in 4% PFA. Coronal brain slices (50  $\mu$ m thick) were obtained with a VT1000S vibratome (Leica) and collected as floating sections. For immunostaining, slices were first washed with PBS and permeabilized with 0.2% Triton/PBS. Nonspecific binding was blocked with PBS containing 1–5% goat serum and 0.3% Triton-X 100 for 1 h. Samples were then incubated with the corresponding primary antibodies in blocking solution overnight at 4 °C: rabbit anti-S100- $\beta$  (1:200, Abcam, Cambridge, UK; RRID: AB\_306716), mouse anti-SERT (1:500, Synaptic Systems Cl.64G6), mouse anti-Neuronal Nuclei (NeuN, 1:500, Merck, MAB377), rabbit anti-5HT2AR (1:100, Immunostar, 24288). After three 20-min washes in blocking solution at RT, floating sections were incubated for 1 h RT with specific secondary antibodies: Alexa Fluor 488 (goat anti-mouse; 1:200, Bioss Inc., Woburn, MA, RRID:AB\_10892893); Alexa Fluor 647 (goat anti-rabbit; 1:200, Thermo Fisher Scientific, RRID:AB\_2535813); Alexa Fluor 488 (goat anti-rabbit; 1:200, Thermo Fisher Scientific, RRID:AB\_143165); Pacific blue (goat anti-mouse 1:200, Thermo Fisher Scientific, RRID:AB\_10374586). After three 20-min of PBS washes containing 0.1% Triton X-100, slices were incubated with DAPI (1.5  $\mu$ g/mL, Sigma-Aldrich) for 10 min. Finally, sections were washed, three times 20-min each, in PBS and mounted with Vectashield antifade mounting medium (H-1000, Vector Laboratories, Burlingame, CA), and images acquired using a Leica SP-5 confocal microscope (Leica Biosystems). Quantification was performed using Fiji software (ImageJ 1.53i, NIH). All the antibodies used in the study have been satisfactorily validated by commercial vendors.

Co-localization of constructs encoded by viral vectors (cyto-GCaMP6f and ChrimsonR-tdTom) with astrocytic, neuronal markers and serotonergic labeling was performed. Maximal projections of z-stacks (10  $\mu$ m thickness) obtained with a 40 $\times$  1.25 NA oil immersion objective (single optical sections 2  $\mu$ m) for GCaMP6f images, and 63 $\times$  1.40 NA oil immersion objective (single optical sections 1  $\mu$ m) for ChrimsonR-tdTom images were used (Leica SP-5). After thresholding the GCaMP6f or ChrimsonR-tdTom image a mask was created. This mask was superimposed over the astrocytic marker S100 $\beta$ , neuronal marker NeuN or serotonergic projections labeled with anti-SERT image, and ROIs were automatically (ChrimsonR-tdTom image) and manually (GCaMP6f image) detected and measured. 5 background ROIs were manually selected in the S100 $\beta$ , NeuN and anti-SERT image. Colocalization was considered when the mean intensity value of S100 $\beta$ , NeuN and anti-SERT ROIs was above the background average plus 3 times the standard deviation of the signal. Positive ROIs were tagged with 1, whereas negative ROIs were tagged with 0, and the percentage of positive ROIs was calculated for each field of view.

The presence of 5-HT2AR puncta in mPFC astrocytes was determined using Fiji. Maximal projection of 3  $\mu$ m of thickness was obtained from images acquired with 40 $\times$  1.3 NA oil immersion objective in Stellaris 8 STED (Leica). Astrocyte somata and processes were manually identified by endogenous EGFP labeling in *Aldh1/1*-EGFP mice using the ROI manager tool. The number of puncta within identified *Aldh1/1*-EGFP astrocytes was assessed using the process Find Maxima in Fiji software, establishing the prominence value as the mean background fluorescence plus 5 times the standard deviation. Astrocytes were considered positive for 5-HT2AR expression when at least 4 puncta were detected.

### Behavioral assays

Handling period was performed for 5 min during 5 consecutive days before behavioral testing, which started 3 days after ending Cort-treatment. Mice were transferred to the testing room for at least 30 min before the experiment to reduce stress [70]. All tasks were performed between 08:00 am and 3:00 pm. Arenas and maze were cleaned with a 0.1 % acetic acid dissolved in water between the sessions.

**Forced swimming test (FST).** FST was performed in a clear acrylic cylinder (29 cm height, 12 cm diameter) filled with warm water (22–23 °C). Mouse behavior was video-recorded for 6 min. Immobility score was analyzed during the last 4 min using EthoVision XT 7 software (Noldus Information Technology, Inc.; Leesburg, VA). Time when mice were immobile was used as indicator of hopelessness, which has been related with depressive-like phenotypes in rodents [71, 72].

**Elevated plus maze (EPM) test.** EPM is used as a reference of mouse anxiety levels [73]. The maze had two closed and two open arms (30  $\times$  10  $\times$  5 cm each) and is placed 1 m above the ground. At the beginning of the session (5 min total duration), the animal was placed at the intersection of the arms. The time spent in the open and enclosed arms was recorded by EthoVision XT 7 software. The exploration index was computed as the time spent in open arms vs the total time spent in open and closed arms. An entry was considered when the mouse had all four paws inside the arm of the maze.

**Object in place (OIP) test.** Acrylic open field arena (40  $\times$  40  $\times$  40 cm) with 4 non-identical objects placed near the corners of the arena [74] was used. Mouse behavior was recorded by EthoVision XT 7 software. In total, 3 days prior testing, animals were individually habituated to explore the empty arena for 30 min. In the first trial, animals were allowed to freely explore the different objects for 5 min. After 5 min of inter-trial delay, mice were allowed to explore for 3 min the arena where two objects were reallocated (new object location). The index was computed as the time spent exploring the objects in novel locations of the total time exploring. Exploration was defined as reaching the object with the nose.

**Novel object recognition (NOR) test.** NOR test was conducted using the same arena as OIP. Once mice were habituated to the arena, they were allowed to explore two identical objects for 5 min. After one hour, mice are reintroduced into the arena where an object has been replaced by a novel one [75]. The index was computed as the total time spent exploring novel object versus the total time of exploration (novel + familiar).

**Open field (OF) test.** OF test was conducted using the same arena as OIP and NOR. Once mice were habituated to the arena, they were allowed to



move freely in the arena for 5 min. Movement cumulative duration time (s) was recorded by EthoVision XT 7 software.

**Social recognition (SR) test.** Sociability measurements were performed in a clear acrylic three-chamber cage (60 × 42 × 20 cm each) [76, 77]. The middle chamber was used as a resting point, and the chambers on the side hold two small cylindrical cages that contained an unfamiliar mouse or a neutral small object [78, 79]. Unfamiliar male mice were habituated to remain into the cylinder cages 2 days prior testing. On the testing day, mice were placed in the middle chamber (to prevent access to the side chambers, clear acrylic sliding doors were used), and were allowed to explore it for 5 min. Afterwards, the doors were opened and the animal was able to freely explore the “social chamber” (holding the unknown mouse) or the “non-social chamber” (holding the object) for 10 min. An exploration was considered when mouse’s nose was in contact with the cage.

For CNO or AIDA experiments, i.p. injections were conducted 20–30 min before the beginning of each task. Saline (vehicle) was i.p. injected as control in a subset of mice. Animals with no exploratory behavior in a particular test were eliminated from the analysis of that test.

### Drugs and chemicals

The following reagents were bath-applied during ex vivo recordings for at least 15 min before testing: picrotoxin (50  $\mu$ M, Sigma, Cat#P1675; CAS:124-87-8), D-AP5 (50  $\mu$ M, Tocris, Cat#0106; CAS: 79055-68-8), LY367385 (100  $\mu$ M, Tocris, Cat#1237; CAS: 198419-91-9), SB 216641 hydrochloride (50  $\mu$ M, Tocris, Cat#1242; CAS 193611-67-5) AM251 (2  $\mu$ M, Tocris, Cat#1117; CAS: 183232-66-8), MRS 2179 tetrasodium salt (10  $\mu$ M, Tocris, Cat#0900; CAS: 1454889-37-2), CGP 55845 hydrochloride (5  $\mu$ M, Tocris, Cat#1248; CAS 149184-22-5), Ketanserin tartrate (10  $\mu$ M, Tocris, Cat#0908 CAS 83846-83-7), RS127445 hydrochloride (1  $\mu$ M, Tocris, Cat#2993 CAS 199864-86-3), RS102221 hydrochloride (1  $\mu$ M, Tocris, Cat#1050 CAS 187397-18-8), MDL100907 (1  $\mu$ M; Tocris, Cat#4173 CAS 139290-65-6), WAY100135 (10  $\mu$ M; Tocris, Cat#1253 CAS149007-54-5), tetrodotoxin (TTX, 1  $\mu$ M, Alomone labs, Cat#T-550; CAS: 18660-81-6). A constant flow of fresh aCSF plus selected drugs was continuously perfused into the recording chamber. Serotonin hydrochloride (1 mM, Tocris, Cat# 3547 CAS 153-98-0), Clozapine N-oxide (1 mM, Tocris, Cat# 4936 CAS 34233-69-7), and Adenose 5'triphosphate disodium salt hydrate (ATP, 1 mM, Sigma-Aldrich, Cat# A7699) were locally applied by a micropipette. The following inhibitors were added to the intracellular solutions: 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid (BAPTA, 40 mM, Sigma-Aldrich, Cat# A4926), and guanosine 5'-[ $\beta$ -thio]diphosphate (GDP $\beta$ S), trithium salt (2 mM, Merck, Cat# G7637) 1-aminoindan-1,5-dicarboxylic acid (AIDA, 5 mg/kg, Tocris, Cat# 0904 CAS 168560-79-0) and Clozapine N-oxide (3 mg/kg, Tocris, Cat# 4936 CAS 34233-69-7) were administered via i.p. Fluo-4 AM (Invitrogen, Cat# F14201), Pluronic® F-127 (Merck, Cat# P2443), Dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, Cat# D8418).

### Statistical analysis

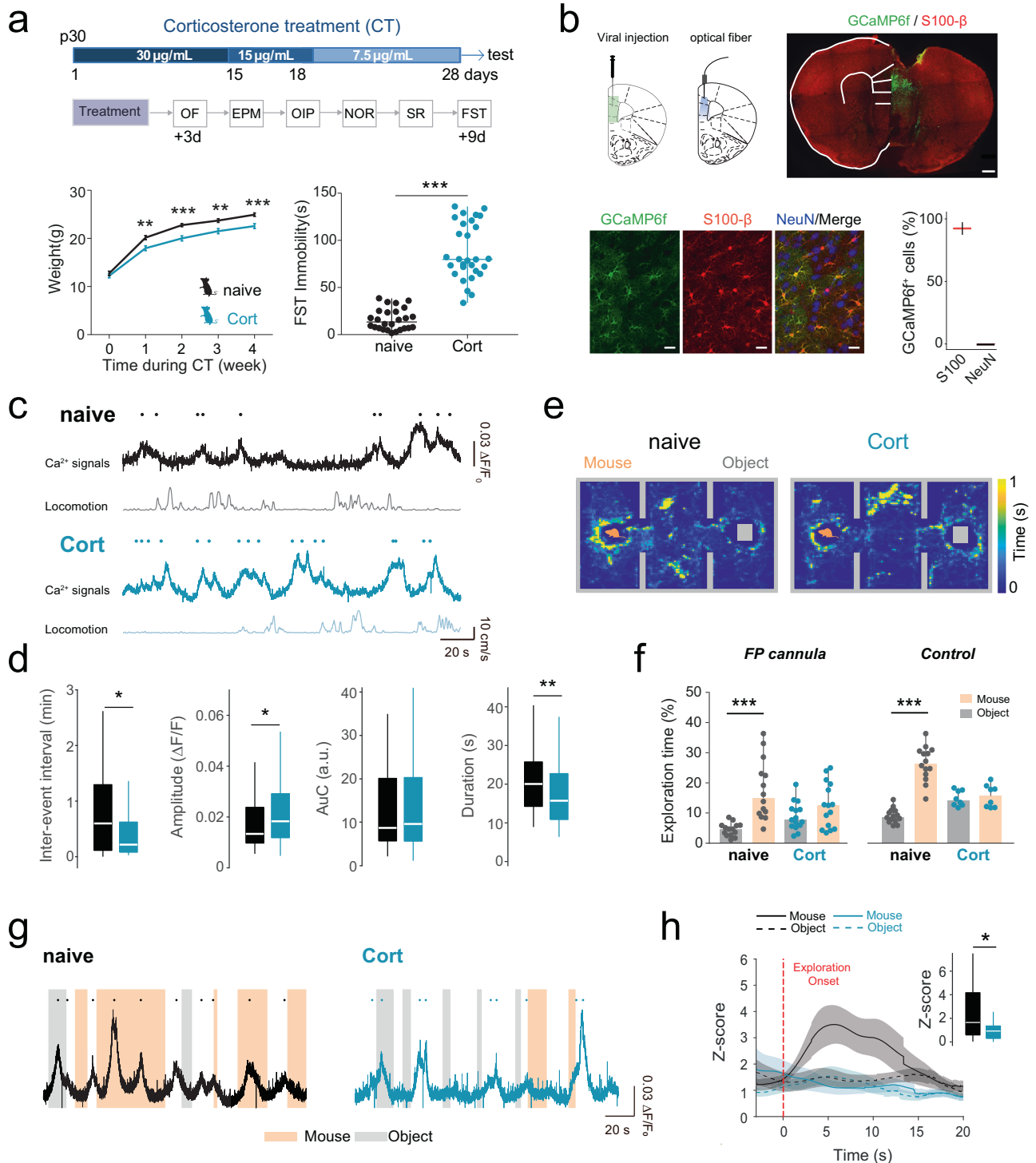
All animal samples and biological replicate numbers in this study are in line with well-accepted standards from the literature for each method. All data presented in this work were obtained from experimental replicates; that is, multiple animal cohorts from different litters, at least three experimental repeats for each assay, and production of biological replicates. All attempts of replication were successful. Each statistical test was used according to the design of the experiment and the structure of the data. According to the normality of the data distribution, two-group comparisons were performed using One Way ANOVA, Kruskal-Wallis on ranks, One-way ANOVA with Dunn’s method, Tukey test and Holm-Sidak post-hoc analysis; or paired *T* test or Wilcoxon matched-pair tests, respectively. In experiments involving several conditions, Two-way ANOVA was performed followed by post-hoc test (Holm-Sidak method). No statistical methods were used to predetermine sample sizes in this study, which were determined according to the accepted practice for the applied assays [9, 80]. Experiments, except the behavioral test, were not performed with blinding to the conditions of the experiments. However, data analyses were performed blinded to the scorer or did not require manual scoring. Descriptive statistics are reported as the mean  $\pm$  s.e.m., and box and whisker plots. In BW plots the central mark indicates the median, and the bottom and top edges of the box indicate the 25th and 75th percentiles, respectively. The whiskers extend to the maximum and minimum data points (not considered outliers). In scatter dot plot graphs, the central mark

indicates the median, and the top and bottom edges, so-called range, correspond to the maximum and minimum values, respectively. Statistically significant differences were established at \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 and \*\*\**P* < 0.001, two-sided.

## RESULTS

### Abnormal astrocyte Ca<sup>2+</sup> dynamics in depressive-like behaviors

Chronic stress and activation of the HPA axis can induce a variety of behavioral responses that parallel depressive symptoms [15]. Additionally, mice treated via oral exposure to the stress hormone corticosterone (Cort) recapitulate the anhedonic- and helplessness-like behaviors. This in turn, is reversible by chronic antidepressant treatment, being considered as a model of stress-induced depressive-like behaviors in rodents [29–31, 33]. Here, we used chronic Cort treatment in juvenile mice (Cort-mice) to evaluate the impact of chronic stress on astrocyte Ca<sup>2+</sup> signaling. Animals stressed in early childhood show increased anxiety-like behavior [81], decreased spatial memory [82] and social impairments [83]. Then, we first confirmed that oral consumption of Cort induced increased levels of hair corticosterone deposits (cf. [56]) without affecting the corticosterone serum levels [33, 55], reduced body weight gain [84], and longer latencies of immobility in the forced swimming test (FST), which supported the efficacy of Cort-treatment to induce depressive-like behaviors in young mice (Fig. 1a, Extended Data Fig. 1a, b) [33, 55]. Next, we analyzed the impact of this treatment on astrocytic Ca<sup>2+</sup> signals, recording Ca<sup>2+</sup> activity in vivo at mPFC in naïve and Cort-mice (Fig. 1). Viral injections of Ca<sup>2+</sup> sensor (AAV5-GFAP-cytoCaMP6f) were performed in both phenotypes and fiber optic were implanted at mPFC to monitor astrocytic Ca<sup>2+</sup> dynamics (Fig. 1b, c). In total, 2–3 weeks later, both spontaneous Ca<sup>2+</sup> events and behavioral-driven responses were evaluated. In the open field test (OF), Cort-mice displayed faster astrocyte Ca<sup>2+</sup> signals (17.39  $\pm$  0.81 s Cort vs 20.57  $\pm$  0.95 s naïve, *n*<sub>Cort</sub> = 90 events, *n* = 6 mice; *n*<sub>naïve</sub> = 60 events, *n* = 7 mice; One Way ANOVA, Dunn’s Method, *P* = 0.007), resulting in a reduced inter-event interval (0.53  $\pm$  0.08 min Cort vs 0.88  $\pm$  0.12 min naïve; One Way ANOVA, Dunn’s Method, *P* = 0.017), with an increased amplitude compared to the control group (0.03  $\pm$  0.004  $\Delta$ F/F<sub>0</sub> Cort vs 0.02  $\pm$  0.003  $\Delta$ F/F<sub>0</sub> naïve; One Way ANOVA, Dunn’s Method, *P* = 0.047) (Fig. 1c, d). Astrocyte resting Ca<sup>2+</sup> levels did not show significant differences between naïve (F<sub>0</sub>: 0.90  $\pm$  0.17, *n* = 7) and Cort-mice (F<sub>0</sub>: 1.10  $\pm$  0.13, *n* = 6; One-Way ANOVA, *P* = 0.388). These data suggest that astrocytes display dysfunctional intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling under depressive-like conditions. Since depression has an important impact on social behaviors [85], we confirmed that Cort-mice showed such social impairments in the three-chamber social test (Fig. 1e, f) [86]. We recorded astrocytic Ca<sup>2+</sup> during the social test and analyzed the Ca<sup>2+</sup> events when mice explored the inanimate object or the caged mouse (Fig. 1g). Interestingly, Cort-mice showed reduced astrocytic Ca<sup>2+</sup> activity during mouse explorations compared to the control group (Fig. 1h). While astrocytic Ca<sup>2+</sup> events during the explorations of the inanimate object were similar in both groups (1.42  $\pm$  0.36 Cort vs 1.38  $\pm$  0.26 naïve, *n*<sub>Cort</sub> = 29 events, *n* = 6 mice; *n*<sub>naïve</sub> = 35 events, *n* = 7 mice; One Way ANOVA, Dunn’s Method, *P* = 0.471), Ca<sup>2+</sup> fluorescence signals during social interactions were decreased in Cort-mice (1.12  $\pm$  0.23 Cort vs 3.26  $\pm$  0.69 naïve, *n*<sub>Cort</sub> = 26, *n*<sub>naïve</sub> = 34 events, One Way ANOVA, Dunn’s Method, *P* = 0.031) (Fig. 1h). Additionally, the relationship between animal running speed and Ca<sup>2+</sup> events amplitude was analyzed in order to evaluate any possible confounding between astrocytic activity and locomotion [87–89]. No significant correlation was found between those parameters, suggesting a non-direct effect of locomotion to the population astrocytic Ca<sup>2+</sup> signals in mPFC (Extended Data Fig.1c, d). These results indicated that depressive-like behavior induced a robust



impact on the intracellular Ca<sup>2+</sup> in mPFC astrocytes both for baseline activity and social-engaged behaviors.

#### Altered serotonergic-driven astrocytic Ca<sup>2+</sup> responses in depressive-like states

Dysfunctions of the 5-HT system are involved in mood disorders, including depression [90]. Since astrocytes express transporters and receptors for the sensing of serotonergic transmission [91], we continued by analyzing the astrocytic Ca<sup>2+</sup> responses induced by 5-HT local stimulation in naïve and Cort-mice in

mPFC brain slices. Following a similar viral strategy, AAV5-GFAP-cytoGCaMP6f was selectively expressed in mPFC astrocytes and local Ca<sup>2+</sup> events were monitored in basal conditions and in response to local 5-HT application (1 mM, air puff 10 s, 1 bar) (Fig. 2a). Basal activity recordings in presence of TTX (1  $\mu$ M) displayed significant differences between astrocytes from naïve and Cort-mice. Faster Ca<sup>2+</sup> events ( $17.33 \pm 0.45$  s Cort vs  $22.95 \pm 0.77$  s naïve,  $n_{\text{Cort}} = 190$  ROIs;  $n_{\text{naïve}} = 117$  ROIs,  $n = 2$  Cort-mice,  $n = 3$  naïve mice; One Way ANOVA, Dunn's Method,  $P < 0.001$ ) with reduced amplitude ( $0.19 \pm 0.01$   $\Delta F/F_0$  Cort vs

**Fig. 1** Altered astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics during social interactions in Cort-mice. **a** Top, Scheme of corticosterone (Cort) treatment protocol for 28 days followed by behavioral testing. Decreased doses of Cort were applied at different time points. Behavioral testing schedule. OF, EPM, OIP, NOR, SR and FST were conducted sequentially from 3 days (OF) to 9 days after treatment (FST). Bottom left, body weights for naïve (in black, as in the rest of the figure) and Cort-mice (in blue, as in the rest of the figure) were monitored during the entire Cort treatment. Naïve mice were exposed to water as control. Note the reduced gain of weight for Cort-mice ( $n = 26$  for naïve;  $n = 29$  for Cort). One Way ANOVA, Holm-Sidak method.  $P = 0.002$ ,  $P < 0.001$ . Data are presented as mean  $\pm$  s.e.m. Bottom right, cumulative duration of immobility during force swimming test (FST) in naïve ( $n = 26$ ) and Cort mice ( $n = 29$ ), showing an increased immobility rates compare to their naïve littermates. One Way ANOVA, Dunn's test.  $P < 0.001$ . Data are shown as median  $\pm$  range (min and max values). **b** Top, schematic representation of mPFC area targeted with AAV5-GFAP-GCaMP6f viral injection and optical fiber implantation in naïve and Cort-mice. Confocal image showing the selective viral expression (green) in astrocytes (S100 $\beta$ , red) in mPFC. Scale bar: 500  $\mu\text{m}$ . Bottom left, representative confocal images showing GCaMP6f expression and astrocytic (S100 $\beta$ ) and neuronal markers (NeuN) labeling. Scale bar: 20  $\mu\text{m}$ . Bottom right, colocalization analysis of GCaMP6f positive cells and S100 $\beta$  and NeuN labeling (162 GCaMP6f positive cells from 3 slices, 3 mice; One Way ANOVA, Tukey test,  $P < 0.001$ ). **c** Representative in vivo astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  activity traces from fiber photometry recordings and speed in naïve (top) and Cort-mice (bottom) during open field explorations. Dots denote the peak of astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  events. **d** Box and whisker (BW) plots analysis of  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics in both groups (naïve = 7, Cort = 6). One Way ANOVA, Dunn's Method,  $P > 0.05$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ . **e** Representative spatial heatmaps for naïve and Cort-mice during a social recognition task. Color code denotes accumulated time. **f** Behavioral analysis of social preference for naïve and Cort-mice both implanted with the fiber photometry cannula (FP; naïve = 14, Cort = 15), and mice without surgical manipulations (Control, naïve = 14, Cort = 8), showing similar performance. Note that cannula implantation did not alter social preference. Cort-mice did not display preference for social interaction. Two Way ANOVA, Holm-Sidak method.  $P > 0.05$ . Y-axis represents the time spent exploring either the unfamiliar mouse (orange) or object (gray). **g** Representative astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  activity recordings from fiber photometry in naïve and Cort-mice during a social recognition task. Shaded areas indicate interaction bouts with unfamiliar mouse (orange) or object (gray), and dots indicate astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  events. **h** Z-score of astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  response during mouse (continuous line) and object (dashed line) interaction bouts for naïve ( $n = 7$ ) and Cort-mice ( $n = 6$ ). Events were aligned to the exploration onset. Reduced amplitude of  $\text{Ca}^{2+}$  signals upon mouse interaction was found in Cort-mice ( $n_{\text{Cort}} = 26$ ,  $n_{\text{naïve}} = 34$   $\text{Ca}^{2+}$  events). One Way ANOVA, Dunn's Method,  $P = 0.031$ . The center line in BW plots indicates the median, the top and bottom edges indicate the 25th and 75th percentiles, respectively, and the whiskers extend to the maximum and minimum data points. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

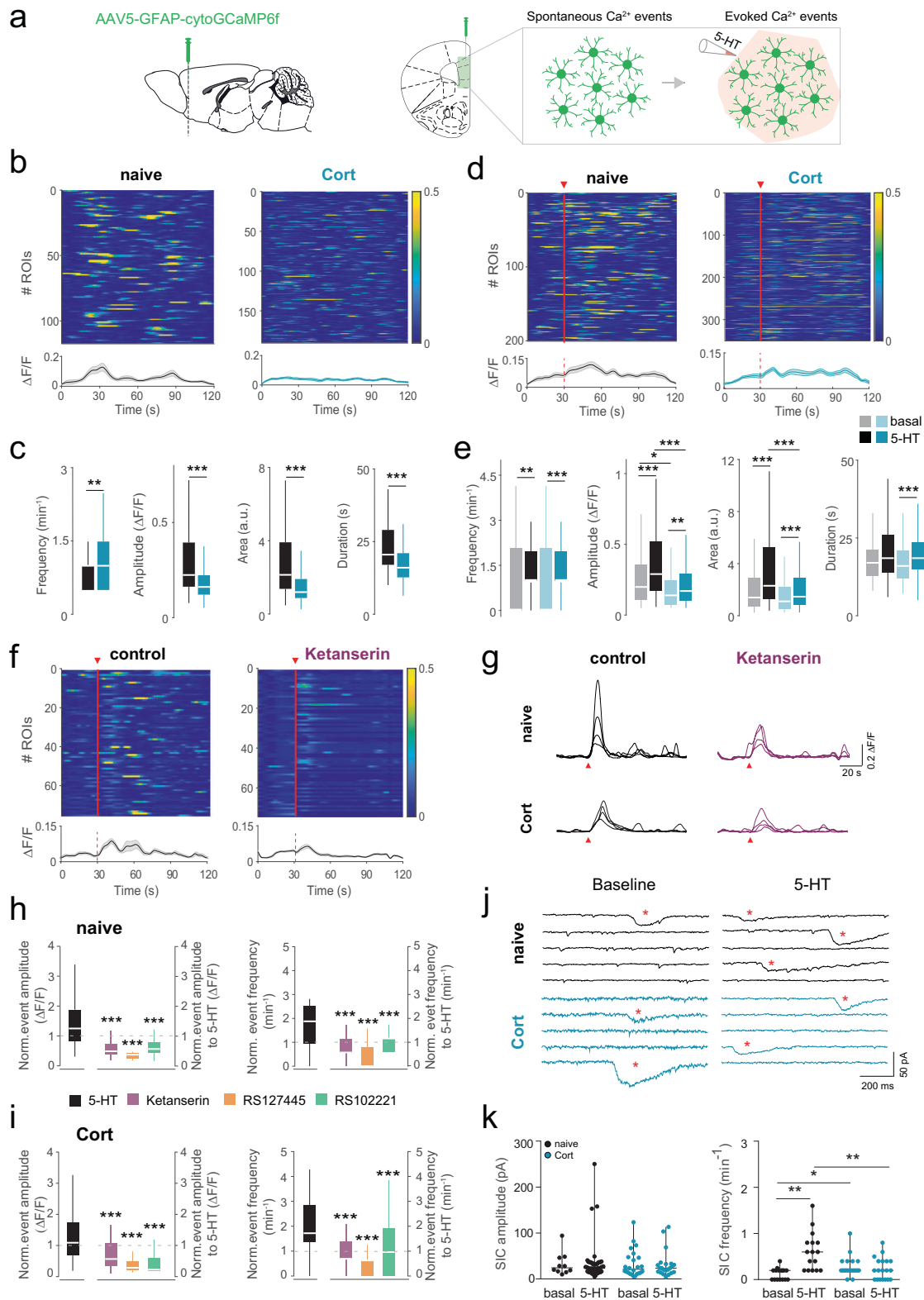
$0.36 \pm 0.03$   $\Delta F/F_0$  naïve; One Way ANOVA, Dunn's Method,  $P < 0.001$ ) were found in Cort-mice (Fig. 2b, c). The analysis of astrocytic resting  $\text{Ca}^{2+}$  levels did show an enhancement of  $F_0$  values in Cort-mice ( $94.48 \pm 2.07$ ,  $n = 190$ ) compared with naïve mice ( $74.68 \pm 1.95$ ,  $n = 117$ ; One-Way ANOVA,  $P < 0.001$ ). In addition, mPFC astrocytes from Cort-mice showed higher frequencies of  $\text{Ca}^{2+}$  events ( $1.03 \pm 0.04$  s Cort vs  $0.85 \pm 0.04$  s naïve; One Way ANOVA, Dunn's Method,  $P = 0.006$ ) (Fig. 2c), in line with the abnormal  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics found in in vivo recordings. Next, we found that local application of 5-HT was able to engage  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in mPFC astrocytes in both conditions (Fig. 2d, e), but Cort-mice showed a reduced amplitude in 5-HT-driven astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  events ( $0.28 \pm 0.02$   $\Delta F/F_0$  Cort vs  $0.40 \pm 0.03$   $\Delta F/F_0$  naïve; One Way ANOVA, Dunn's Method,  $P < 0.001$ ) (Fig. 2e). Remarkably, in contrast to 5-HT-mediated signaling, Cort-mice showed enhanced astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  events induced by ATP (1 mM, 10 s, 1 bar), a potent inductor of astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  elevations [92], compared to naïve astrocytes ( $1.17 \pm 0.08$   $\Delta F/F_0$  Cort-mice vs  $0.89 \pm 0.05$   $\Delta F/F_0$  naïve mice; One Way ANOVA, Dunn's Method,  $P = 0.006$ ; Extended Data Fig. 2a, b). These results confirmed the dysfunctional astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in Cort-mice and the selective downregulation of 5-HT-driven astrocytic responses.

$\text{Ca}^{2+}$  signaling has been associated with the release of active substances from astrocytes, such as glutamate, d-Serine, ATP among others [1, 2, 93], which impact both functional and structurally synaptic activity and behavior [94, 95]. Astrocytes can stimulate neuronal NMDA receptors activation inducing slow inward currents (SICs) and modulating neuronal excitability [68, 96]. Here, we analyzed the ability of mPFC astrocytes to induce SICs in principal cells from layer 2/3 in mPFC in naïve and Cort conditions. SICs were recorded in basal conditions in both naïve and Cort-mice (Fig. 2j), but only naïve mice displayed a significant increase after 5-HT stimulation ( $0.61 \pm 0.10$  min $^{-1}$  naïve vs  $0.24 \pm 0.05$  min $^{-1}$  Cort.,  $n_{\text{naïve}} = 16$  SICs,  $n = 2$  mice;  $n_{\text{Cort}} = 19$  SICs,  $n = 3$  mice; One Way ANOVA, Dunn's Method,  $P = 0.002$ ) (Fig. 2k). Additionally, Cort-neurons showed an elevated SIC frequency in resting conditions ( $0.27 \pm 0.05$  min $^{-1}$  Cort. vs  $0.13 \pm 0.03$  min $^{-1}$  naïve; One Way ANOVA, Dunn's Method,  $P = 0.033$ ), which might correlate with the increased frequency of  $\text{Ca}^{2+}$  events found in astrocytes from Cort-mice (Fig. 2c). These

data suggest that not only the spontaneous activity, but also 5-HT-engaged astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signaling and gliotransmission were compromised in depressive-like behaviors.

Among the different receptors of the 5-HT system, astrocytes from mPFC express 5-HT $_2$  receptors, including 2A, 2B and 2C, which are coupled to IP3 intracellular signaling [97–99], one of the main routes to trigger intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  elevations in astrocytes [100]. Thus, we evaluated the role of these receptors in the 5-HT-driven astrocyte responses (Fig. 2f–i). Blockade with selective antagonists for the different 5-HT $_2$  receptor subtypes, ketanserin for 5-HT $_2A$ , RS127445 for 5-HT $_2B$  and RS102221 for 5-HT $_2C$ , resulted in a significant reduction of both the amplitude and frequency of astrocyte 5-HT-driven  $\text{Ca}^{2+}$  events in control and Cort-mice (Fig. 2f–i), indicating that Cort-treatment involved important changes in astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics in mPFC affecting spontaneous, but also 5-HT-engaged signaling. The expression of 5-HT $_2A$  in astrocytes was evaluated by immunohistochemical studies in *Aldh1/1-EGFP* mice [101] (Extended Data Fig. 3a). These results support at least 5-HT $_2A$  receptor expression in cortical astrocytes and further confirm the functional evidences shown by  $\text{Ca}^{2+}$  imaging. Ketanserin has been described to block 5-HT $_2C$  receptors [102], which might cover the selective actions of 5-HT $_2ARs$  to the astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  signaling. Then, a more selective 5-HT $_2A$  antagonist MDL100907 (1  $\mu\text{M}$ ) was used (Extended Fig. 3b–d), which corroborated the role of 5-HT $_2ARs$  in the 5-HT-driven astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signals. In addition, the dependence of IP3-engaged intracellular signaling in astrocytes by 5-HT was evaluated and  $\text{Ca}^{2+}$  recordings were performed in *Ip3r2 $^{-/-}$*  mice, which show downregulated  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in astrocytes [100]. As expected, 5-HT stimuli did not evoke significant  $\text{Ca}^{2+}$  changes (Extended Data Fig. 3e, f). Finally, to ensure the main role of 5-HT $_2Rs$  to the 5-HT-driven astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  responses the contribution of other 5-HTRs, e.g., 5-HT $_1A$ , was evaluated. The presence of WAY100135 (10  $\mu\text{M}$ ), a selective antagonist of 5-HT $_1A$ , did not affect the 5-HT induced  $\text{Ca}^{2+}$  signals in cortical astrocytes (Extended Data Fig. 3g, h), supporting the relationship between activation of 5-HT $_2R$  family and astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signaling.

Depression behavior has been associated with low concentrations of 5-HT in different brain areas [103–105]. Hence, we next investigated whether the reported abnormal  $\text{Ca}^{2+}$  responses in astrocytes induced by Cort-treatment might be related to reduced

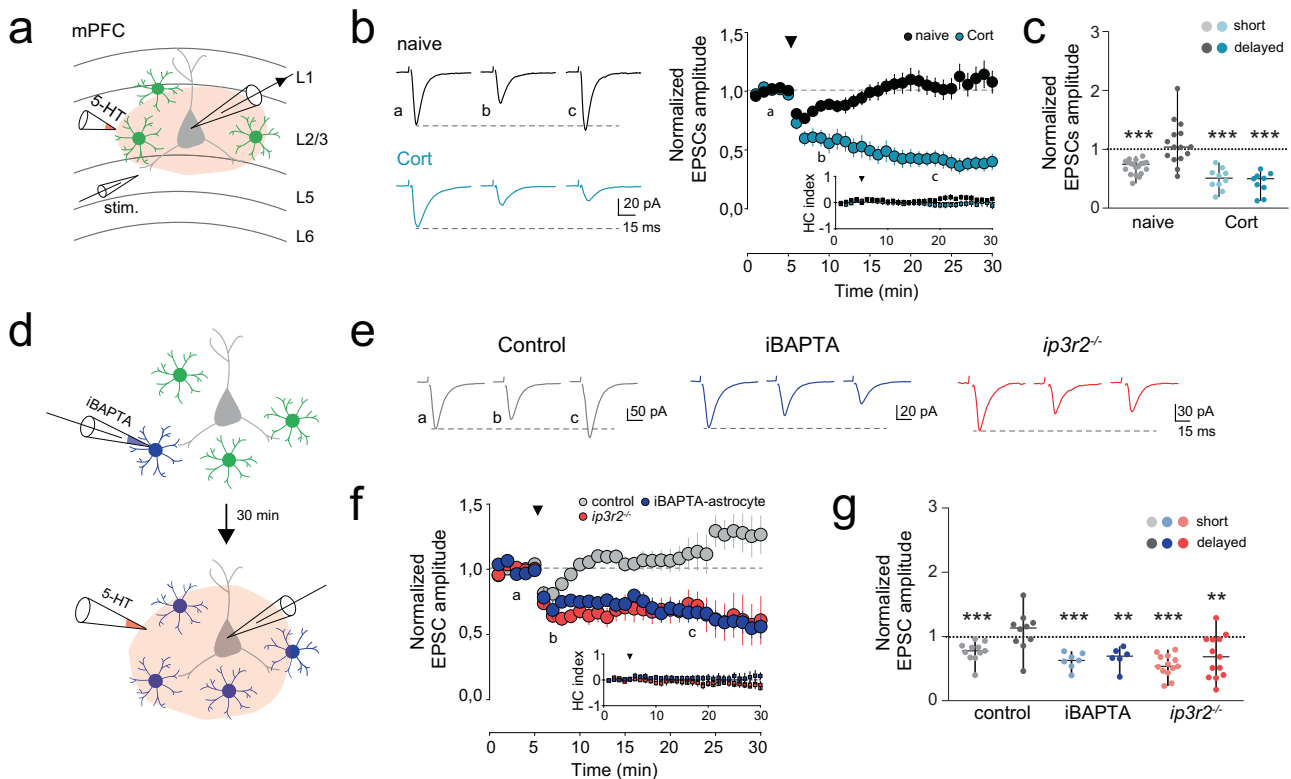


levels of 5-HT in mPFC. To do so, we evaluated the ability of mPFC astrocytes to sense the endogenous release of 5-HT from serotonergic brain areas, such as DRN. First, via ex vivo recordings in naïve mice, we found that 45.9% of the recorded mPFC astrocytes showed robust Ca<sup>2+</sup> responses after selective light stimulation of

DRN afferents (550 nm light pulses of 50 ms at 5 Hz 1 mW) expressing the excitatory opsin ChrimsonR (AAV9-hSyn-ChrimsonR-tdTom) targeting mPFC (Extended Data Fig. 4a–d); confirming that DRN neuronal activity can stimulate Ca<sup>2+</sup> signaling in mPFC astrocytes (Extended Data Fig. 4d, e). Next, by in vivo recordings,



**Fig. 2 Spontaneous and 5-HT-evoked astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in naïve and Cort-mice.** **a** Left. Sagittal and coronal scheme of viral injection in the mPFC (green shaded area) to target astrocytes using AAV5-GFAP-GCaMP6f virus. Right. Schemes of spontaneous and 5-HT-evoked calcium events in mPFC astrocytes. **b** Heatmaps of spontaneous ROIs activity and average population activity in astrocytes of naïve (black,  $n = 117$  ROIs,  $n = 3$  mice) and Cort-mice (blue,  $n = 190$  ROIs,  $n = 2$  mice). Data are presented as mean  $\pm$  s.e.m. Color code denotes fluorescence changes. **c** Box and whisker (BW) plots representing the dynamics of  $\text{Ca}^{2+}$  astrocytic events in naïve and Cort mice. Cort-mice showed an increased frequency of  $\text{Ca}^{2+}$  events ( $P = 0.006$ ) but decreased amplitude, area and duration of events. One Way ANOVA, Dunn's Method,  $P < 0.001$ . **d** Heatmaps of 5-HT evoked ROIs activity and average population activity in astrocytes of naïve ( $n = 200$ ,  $n = 3$  mice) and Cort-mice ( $n = 350$ ,  $n = 2$  mice). Red triangle and bar denote 5-HT puff application (1 mM, 10 s, 1 bar). **e** BW plots representing the dynamics of  $\text{Ca}^{2+}$  astrocytic events in response to 5-HT of naïve and Cort-mice. Reduced amplitude and area of  $\text{Ca}^{2+}$  events were found in Cort-mice (black bars vs dark blue bars). One Way ANOVA, Dunn's Method,  $P < 0.001$ . **f** Heatmaps of 5-HT evoked ROIs activity and average population activity in astrocytes of naïve mice, in basal conditions (left) and in presence of ketanserin (right,  $n = 75$ ,  $n = 2$  mice). **g** Representative traces of  $\text{Ca}^{2+}$  astrocytic signals from naïve and Cort-mice evoked by local 5-HT puff (red triangle) in control conditions (left, black) and after bath application of ketanserin (right, purple). **h, i** BW plots representing changes in amplitude and frequency of  $\text{Ca}^{2+}$  events induced local 5-HT stimulation before (black) and after bath application of 5-HT2R family antagonists (ketanserin, purple; RS127445, orange,  $n = 70$ ,  $n = 2$  mice; RS102221, green,  $n = 69$ ,  $n = 2$  mice) in naïve mice (**h**), and Cort-mice (ketanserin,  $n = 47$ ,  $n = 2$  mice; RS127445,  $n = 70$ ,  $n = 2$  mice; RS102221,  $n = 51$ ,  $n = 2$  mice) (**i**).  $\text{Ca}^{2+}$  event amplitude and frequency induced by 5-HT was normalized to spontaneous activity before 5-HT stimulation (black bars). These parameters were normalized to the  $\text{Ca}^{2+}$  signals evoked by 5-HT before 5-HT2R antagonists family blockade. Note the reduced activity under the influence of each antagonist.  $P < 0.001$ . One Way ANOVA, Dunn's method. **j** Representative traces of slow inward currents (SICs) before and after local 5-HT application (1 mM, 10 s, 1 bar) in naïve and Cort-mice. Red asterisk indicates the presence of SICs. **k** Scatter plot of SICs recorded before (5 min) and after 5-HT (5 min) showing a significant increase in frequency after 5-HT stimulation in naïve mice ( $n = 16$  cells,  $n = 2$  mice; Tukey Test,  $P < 0.001$ ), without further changes in current amplitude for both naïve and Cort-mice ( $n = 19$  cells,  $n = 3$  mice). One Way ANOVA, Dunn's Method,  $P = 0.758$  for naïve,  $P = 0.982$  for Cort. Note the enhanced SICs frequency in resting conditions for Cort-mice, which were insensitive to further increase by 5-HT stimulation. One Way ANOVA, Dunn's Method,  $P = 0.033$ . Data shown as median  $\pm$  range (min and max values). The center line in BW plots indicates the median, the top and bottom edges indicate the 25th and 75th percentiles, respectively, and the whiskers extend to the maximum and minimum data points. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .



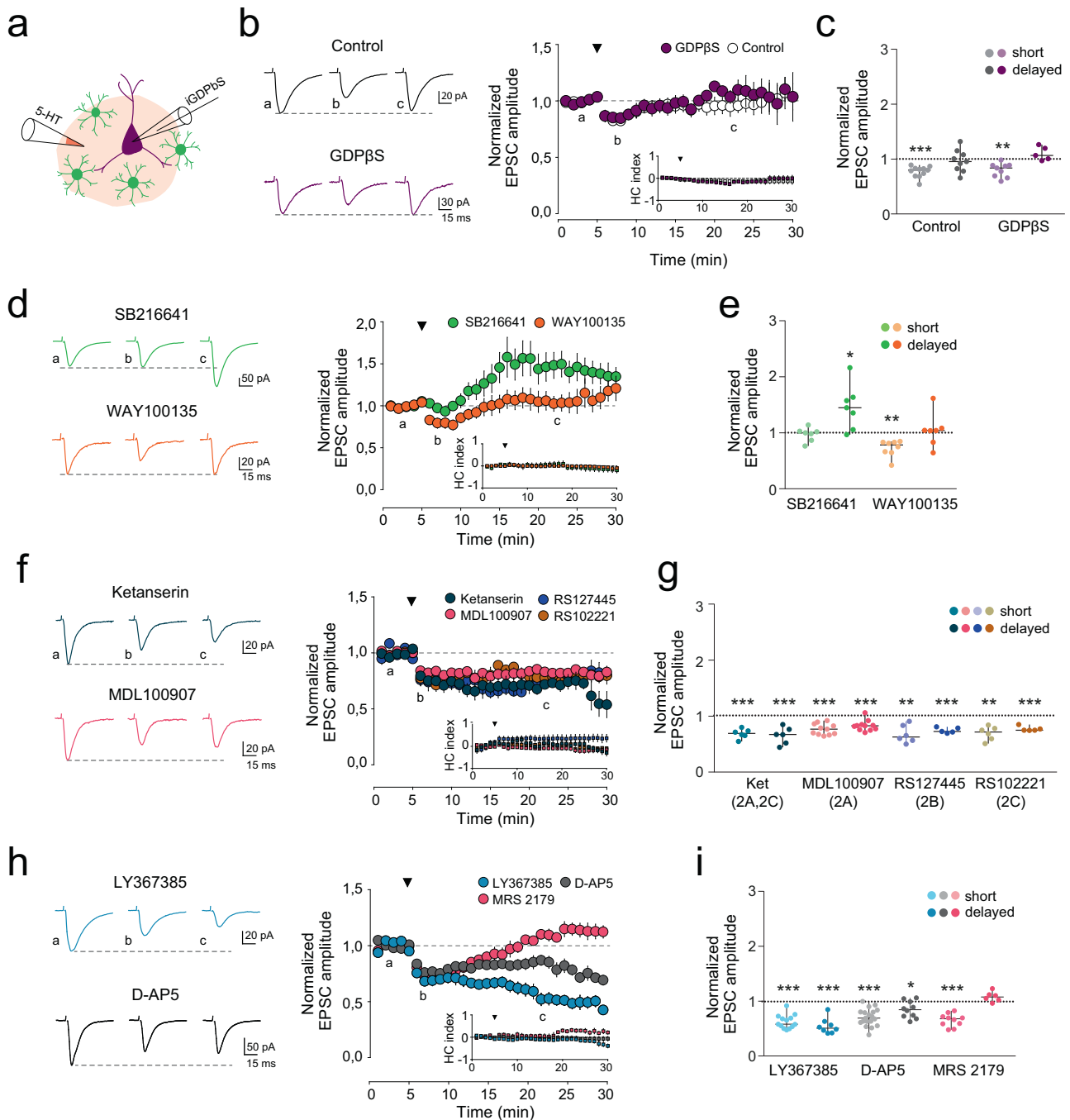
**Fig. 3 mPFC abnormal 5-HT driven synaptic plasticity in depressive-like conditions.** **a** Schematic representation of whole-cell recording of pyramidal neurons in layer 2/3 mPFC slices and neighboring astrocytes, including the glass pipettes for electrical stimulation in layer 5 and local puff of 5-HT in layer 2/3. **b** Left, representative EPSC traces (average from 20 consecutive responses) recorded from pyramidal neurons before (**a**), and after (**b, c**) 5-HT application in naïve (black) and Cort-mice (blue). Short (**b**) and delayed (**c**) synaptic responses are shown. Right, average of normalized EPSC amplitude and Holding Current (HC) index over time before and after 5-HT stimulus in naïve ( $n = 19$  cells,  $n = 8$  mice) and Cort-mice ( $n = 10$  cells,  $n = 5$  mice). Black triangle denotes 5-HT local puff application (1 mM, 10 s, 1 bar). Data shown as mean  $\pm$  s.e.m. **c** Scatter plot of EPSC amplitude changes analyzed during the first 5 min of 5-HT, for short, and after 25 min for delayed synaptic effects. Note the sustained synaptic depression of EPSCs in Cort mice ( $n = 9$  cells); Paired- $t$  test,  $P < 0.001$ . Data shown as median  $\pm$  range (min and max values). **d** Schematic drawing of intracellular loading of BAPTA into the astrocyte network followed by pyramidal neuron recordings and 5-HT local puff application. **e** Representative EPSC traces (average from 20 consecutive responses) recorded from pyramidal neurons before (**a**), and after (**b, c**) 5-HT application in control mice (gray), iBAPTA-astrocyte control mice (blue) and  $ip3r2^{-/-}$  mice (red). Short (**b**) and delayed (**c**) synaptic responses are shown. **f** Average of normalized EPSC amplitude and HC index over time before and after 5-HT stimulus in control mice ( $n = 11$  cells,  $n = 7$  mice), iBAPTA-astrocyte control mice ( $n = 7$  cells,  $n = 5$  mice) and  $ip3r2^{-/-}$  mice ( $n = 13$  cells,  $n = 10$  mice). **g** Scatter plot of EPSC amplitude changes analyzed during the first 5 min of 5-HT, for short, and after 25 min for delayed synaptic effects. Note that reduced astrocyte calcium activity induced a persistent synaptic depression,  $P = 0.004$  for iBAPTA-astrocyte.  $P = 0.006$  for  $ip3r2^{-/-}$  mice. Paired  $t$  test. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

the endogenous release of 5-HT was estimated by using 5-HT (GRAB<sub>5-HT</sub>/iSeroSnFR) sensor [106] expressed specifically in mPFC astrocytes both in naïve and Cort-mice. Viral injections were performed using a combination of AAV5-GFAP-mCherry-cre + AAV5-CAG-flex-iSeroSnFR for selective GRAB<sub>5-HT</sub> expression in mPFC astrocytes, while AAV9-hSyn-ChrimsonR-tdTom was expressed in DRN neurons (Extended Data Fig. 5). Light stimulation of DRN neurons (40 Hz, 10 s) boosted GRAB<sub>5-HT</sub> fluorescence changes in mPFC in naïve mice (from  $0.22 \pm 0.18$  to  $1.56 \pm 0.35$ ,  $n = 3$  mice; One Way ANOVA, Holm-Sidak method,  $P = 0.010$ ), while attenuated fluorescence signals were obtained from Cort-mice after DRN stimulation ( $0.33 \pm 0.25$  in Cort-mice vs  $1.56 \pm 0.35$  in naïve mice,  $n_{\text{Cort}} = 3$ ,  $n_{\text{naïve}} = 3$  mice; One Way ANOVA, Holm-Sidak method,  $P = 0.006$ ) (Extended Data Fig. 5e, f). Altogether, these data not only support the hypothesis that depressive-like behaviors are related

with reduced 5-HT levels (cf [103, 104]), but also highlight the capability of astrocytes to sense serotonergic activity far from the serotonergic nuclei.

### Abnormal 5-HT driven synaptic transmission in corticosterone-treated mice

It has been reported that depressive-like states disrupt excitatory synaptic transmission and synaptic plasticity [107]. Synaptic transmission and plasticity are tightly regulated by serotonergic signaling [108], which is related to important physiological processes, such as sleep, body temperature, appetite, pain and motor activity [109]. Next, we further analyzed the impact of Cort-treatment on 5-HT-driven synaptic responses in mPFC. Layer 2/3 is the main intracortical processing layer of the prefrontal cortex, being sensitive to stress and psychiatric diseases [110, 111];



**Fig. 4 Serotonergic and glutamatergic receptors contribute to 5-HT-evoked synaptic plasticity.** **a** Scheme of intracellular loading of GDP $\beta$ S in recording neuron and 5-HT local application in the same field. **b** Left, representative EPSC average traces (average from 20 consecutive responses) recorded from pyramidal neurons before (**a**), and after (**b, c**) 5-HT application in control mice (black) and in GDP $\beta$ S filled neurons-control mice (purple). Short (**b**) and delayed (**c**) synaptic responses are shown. Right, average of normalized EPSC amplitude and Holding Current (HC) index over time before and after 5-HT application in control ( $n = 11$  cells,  $n = 7$  mice) and GDP $\beta$ S-postsynaptic mice ( $n = 9$  cells,  $n = 5$  mice). Black triangle denotes 5-HT puff application for the entire figure. Data shown as mean  $\pm$  s.e.m. **c** Scatter plot of EPSC amplitude changes recorded during the first 5 min for short, and after 25 min for delayed synaptic effects; Paired  $t$  test,  $P \leq 0.001$ . After intracellular loading of neurons with GDP $\beta$ S, 5-HT induced the same response as in control condition (One Way ANOVA,  $P > 0.05$ ). Data shown as median  $\pm$  range (min and max values). **d** Left, representative EPSC average traces (average from 20 consecutive responses) recorded from pyramidal neurons before (**a**), and after (**b, c**) 5-HT application in presence of SB216641 (green) and WAY100135 (orange) in control mice. Right, average of normalized EPSC amplitude and HC index over time before and after 5-HT application in presence of SB216641 ( $n = 7$  cells,  $n = 4$  mice) and WAY100135 ( $n = 8$  cells,  $n = 4$  mice) in control mice. **e** Scatter plot of EPSC amplitude changes recorded during the first 5 min for short, and after 25 min for delayed synaptic effects. 5-HT1B blockade induce a persistent synaptic potentiation of excitatory synaptic transmission (Paired  $t$  test,  $P = 0.023$ ). **f** Left, representative EPSC average traces (average from 20 consecutive responses) recorded from pyramidal neurons before (**a**), and after (**b, c**) 5-HT application in presence of ketanserin (blue) and MDL100907 (pink) in control mice. Right, average of normalized EPSC amplitude, and HC index over time before and after 5-HT application in presence of ketanserin ( $n = 6$  cells,  $n = 3$  mice), MDL100907 ( $n = 11$  cells,  $n = 4$  mice), RS127445 ( $n = 6$  cells,  $n = 2$  mice), and RS102221 ( $n = 6$  cells,  $n = 2$  mice) in control mice. **g** Scatter plot of EPSC amplitude changes recorded during the first 5 min for short, and after 25 min for delayed synaptic effects. 5-HT2R family antagonist induced a persistent synaptic depression of excitatory synaptic transmission (Paired  $t$  test,  $P = 0.002$  for ketanserin,  $P < 0.001$  for MDL100907, RS127445 and RS102221). **h** Left, representative EPSC average traces (average from 20 consecutive responses) recorded from pyramidal neurons before (**a**), and after (**b, c**) 5-HT application in presence of LY367385 (blue) and D-AP5 (gray) in control mice. Right, average of normalized EPSC amplitude and HC index over time before and after 5-HT application in presence of LY367385 ( $n = 13$  cells,  $n = 6$  mice), D-AP5 ( $n = 18$  cells,  $n = 7$  mice) and MRS 2179 ( $n = 10$  cells,  $n = 5$  mice) in control mice. **i** Scatter plot of EPSC amplitude changes recorded during the first 5 min for short, and after 25 min for delayed synaptic effects. LY367385 and D-AP5 induced a persistent synaptic depression of excitatory synaptic transmission (Paired  $t$  test,  $P = 0.008$  for LY367385,  $P = 0.010$  for AP5 \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ).

therefore, excitatory synaptic transmission (EPSCs) was recorded from layer 2/3 principal cells of mPFC brain slices (Fig. 3a, Extended Data Fig. 6). Local application of 5-HT (1 mM, 10 s, 1 bar) evoked a transient depression of EPSCs in control conditions ( $0.70 \pm 0.03$ ,  $n = 19$  cells,  $n = 8$  mice; Paired  $t$  test,  $P < 0.001$ ) (Fig. 3b, c) (cf. [112]), which was confirmed by endogenous release of 5-HT after selective stimulation of DRN projections to mPFC by viral expression of ChrimsonR (Extended Data Fig. 4f, g). Indeed, light activation of DRN-ChrimsonR projecting axons in the mPFC (50 ms at 5 Hz, 550 nm) induced transient EPSC depression in mPFC neurons ( $0.83 \pm 0.02$ ,  $n = 7$  cells,  $n = 4$  mice; Paired  $t$  test,  $P < 0.001$ ) (Extended Data Fig. 4f, g). In contrast, neuronal recordings from Cort-mice showed an enhanced and persistent depression of synaptic transmission for at least 30 min after 5-HT local stimulation ( $0.42 \pm 0.06$ ,  $n = 9$  cells,  $n = 5$  mice; Paired  $t$  test,  $P < 0.001$ ) (Fig. 3b, c).

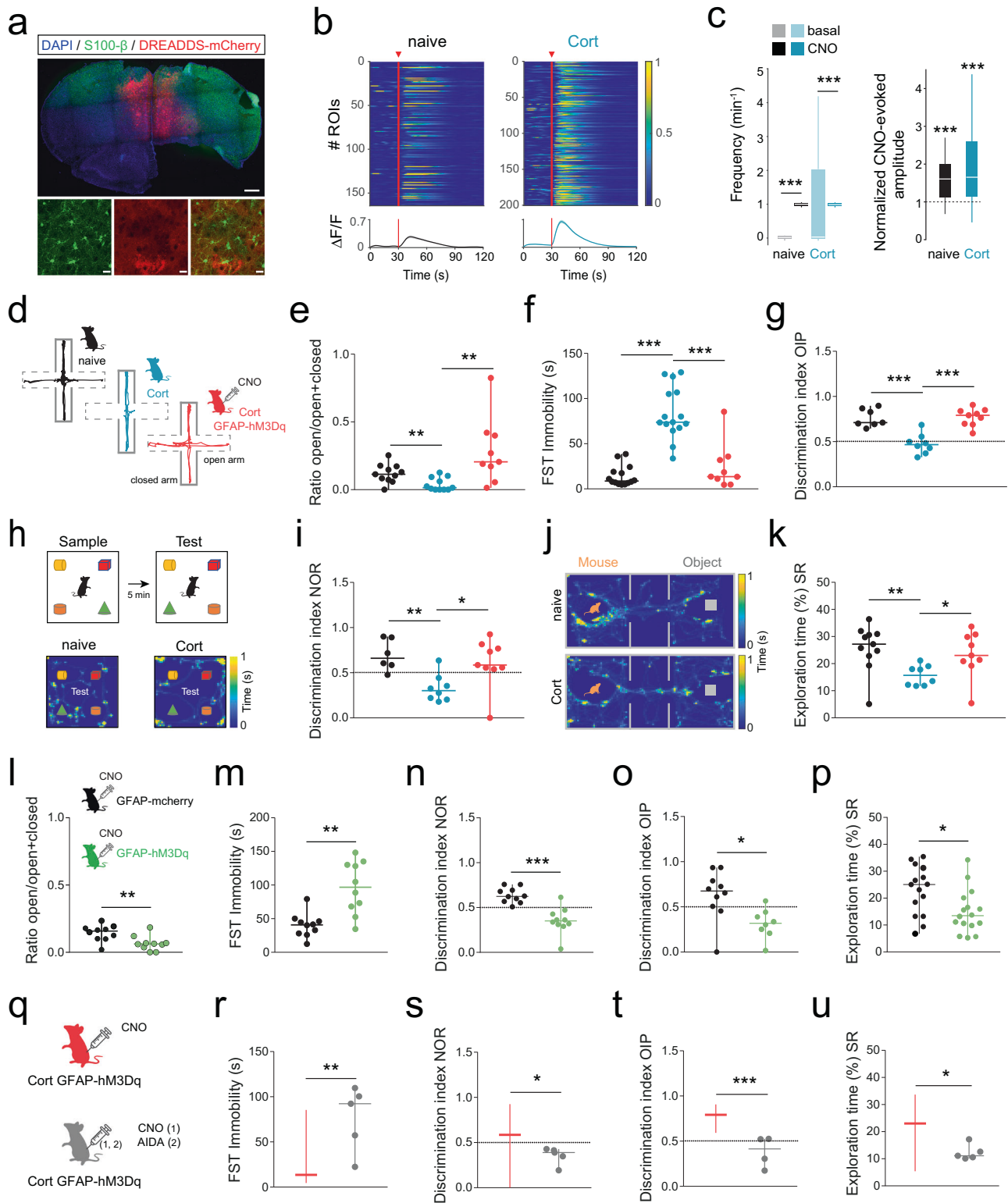
The presence of 5-HT can affect miniature excitatory synaptic responses (mEPSCs) decreasing the frequency of synaptic events [113]. In line with those studies, naïve animals showed a significant decrease of the mEPSCs frequency after 5-HT stimulation ( $0.72 \pm 0.06$ ,  $n = 8$  cells,  $n = 2$  mice, One Way ANOVA, Tukey Test,  $P = 0.012$ ), without affecting the amplitude ( $0.95 \pm 0.04$ , One Way ANOVA, Tukey Test,  $P = 0.105$ ) (Extended Data Fig. 2c, d). However, in Cort-mice neither frequency ( $1.30 \pm 0.33$ ,  $n = 11$  cells,  $n = 3$  mice, One Way ANOVA, Tukey Test,  $P = 0.247$ ) nor amplitude after 5-HT stimulation ( $1.02 \pm 0.02$ , One Way ANOVA, Tukey Test,  $P = 0.700$ ) (Extended Data Fig. 2c, d) were affected, confirming that 5-HT-driven synaptic plasticity was altered in depressive-like states.

#### 5-HT-induced synaptic plasticity requires astrocyte glutamatergic signaling

By regulating structural and physiological features of the synapses, astrocytes have been shown to play critical roles controlling synaptic transmission and plasticity [114]. Hence, we evaluated whether astrocytes might contribute to 5-HT-driven synaptic plasticity. First,  $\text{Ca}^{2+}$  signaling was impaired by dialyzing the  $\text{Ca}^{2+}$  chelator BAPTA (20 mM) into the astrocyte syncytium through the recording pipette [70] in naïve mice, and 30 min later EPSCs at mPFC neurons were recorded (Fig. 3d). In these conditions, 5-HT local stimulation induced a long-lasting depression of EPSC amplitude ( $0.67 \pm 0.07$ ,  $n = 6$  cells,  $n = 5$  mice; Paired  $t$  test,

$P = 0.004$ ) (Fig. 3e–g), similar to 5-HT-evoked responses found in Cort-mice (Fig. 3b, c). Accordingly, neuronal recordings from *lpr2<sup>-/-</sup>* mice showed a remarkably sustained depression of EPSC amplitude after 5-HT stimulation ( $0.69 \pm 0.09$ ,  $n = 13$ ,  $n = 10$  mice; Paired  $t$  test,  $P = 0.006$ ) (Fig. 3e–g), supporting the critical role of astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  signaling for the 5-HT-mediated synaptic plasticity in cortical circuits.

We further investigated the contribution of the postsynaptic 5-HT receptors to the observed responses by including GDP $\beta$ S, a selective blocker of G-protein activity, into the recording pipette (Fig. 4a). In these conditions, where all postsynaptic receptors coupled to G-protein signaling were blocked, including metabotropic 5-HTRs, 5-HT stimulation induced similar transient EPSC depression to control recordings ( $0.80 \pm 0.04$  in GDP $\beta$ S,  $n = 9$  cells,  $n = 5$  mice vs  $0.77 \pm 0.03$  in control,  $n = 11$  cells,  $n = 7$  mice; One Way ANOVA,  $P = 0.572$ ) (Fig. 4b, c), indicating that postsynaptic metabotropic 5-HT receptors did not contribute to the 5-HT driven synaptic plasticity. Presynaptic 5-HT receptors have been found to induce strong modulation of synaptic transmission [115], with particular attention to 5-HT1A and 5-HT1B, which are located on both serotonergic and non-serotonergic presynaptic terminals throughout the brain and induce strong inhibition of neurotransmitter release [112, 116]. Therefore, we next investigated the role of 5-HT1B and 5-HT1A receptors in the synaptic depression evoked by 5-HT in mPFC. The presence of SB216641 (50  $\mu\text{M}$ ), a selective antagonist of 5-HT1B, did prevent the EPSC depression induced by 5-HT stimulation ( $0.97 \pm 0.05$ ,  $n = 7$  cells,  $n = 4$  mice; Paired  $t$  test,  $P = 0.557$ ) (Fig. 4d, e). Indeed, a sustained EPSC potentiation was found in the presence of 5-HT1B blocker ( $1.46 \pm 0.15$ ; Paired  $t$  test,  $P = 0.023$ ) (Fig. 4d, e). In contrast, the blockade of 5-HT1A with WAY100135 (10  $\mu\text{M}$ ) did not prevent the synaptic depression induced by 5-HT ( $0.73 \pm 0.05$ ,  $n = 8$  cells,  $n = 4$  mice; Paired  $t$  test,  $P = 0.001$ ) (Fig. 4d, e), suggesting a predominant role of 5-HT1B receptors for the 5-HT-driven synaptic inhibition accounting in mPFC layer 2/3 [112]. The role of 5-HT1D to the 5-HT-mediated effects has not been tested in our study, so its potential contribution cannot be ruled out. According to the 5-HT-driven astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signaling and 5-HT2Rs signaling, we next investigated whether 5-HT2Rs, 5-HT2A, 5-HT2B and 5-HT2C, were involved in the reported synaptic plasticity. The blockade of 5-HT2A receptor with ketanserin (10  $\mu\text{M}$ ) or MDL100907 (1  $\mu\text{M}$ ) did induce long-lasting EPSC depression (Fig. 4f, g), with similar results



obtained by perfusing selective antagonists of 5-HT<sub>2B</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors (Fig. 4f, g). Remarkably, this sustained synaptic depression simulated that observed by downregulating Ca<sup>2+</sup> signaling in astrocytes (Fig. 3e–g). All in all, present data suggest the cooperative actions of presynaptic 5-HT<sub>1B</sub> and astrocytic 5-HT<sub>2</sub> receptors would account for the net effect of 5-HT-mediated synaptic plasticity.

By releasing active substances, such as glutamate, D-serine, ATP, among others, astrocytes modulate synaptic plasticity and behavior [7]. We next studied the role of these transmitters in 5-HT-driven synaptic plasticity. The presence of LY367385 (50  $\mu$ M), a selective antagonist for metabotropic glutamate receptors type 1a (mGluR1a), and AP5 (50  $\mu$ M), the NMDA receptor antagonist, evoked a long-lasting EPSC depression after 5-HT stimulation



**Fig. 5 Boosted astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in mPFC ameliorates the behavioral deficits shown by Cort-mice.** **a** Confocal imaging of immunohistochemistry-confirmed hM3Dq-mCherry expression (red) in astrocytes (S100- $\beta$ , green). Scale bar, 500  $\mu\text{m}$  (up), 50  $\mu\text{m}$  (down). **b** Heatmaps of CNO-hM3D(Gq) evoked ROIs activity and average population activity in astrocytes of naïve ( $n = 164$ ,  $n = 3$  mice) and Cort-mice ( $n = 200$ ,  $n = 2$  mice). Red triangle and bar denote CNO puff application (1 mM, 2 s, 1 bar). Data are presented as mean  $\pm$  s.e.m. Color code denotes fluorescence change. **c** Box and whisker (BW) plots representing fluctuations of  $\text{Ca}^{2+}$  astrocytic events induced by CNO in naïve and Cort-mice. Both mice showed an increased in normalized CNO-evoked amplitude, Paired  $t$  test,  $P < 0.001$ . **d** Scheme and representative activity traces in EPM for naïve, Cort-mice and Cort-GFAP-hM3Dq mice stimulated with CNO (3 mg/kg, i.p.). **e** EPM exploration index was enhanced in Cort-GFAP-hM3Dq mice vs Cort-mice, showing more entries into the open arms. One Way ANOVA, Dunn's method,  $P = 0.003$ . Data are presented as median  $\pm$  range for the entire figure. **f** FST immobility time was rescued in Cort-GFAP-hM3Dq mice (One Way ANOVA, Tukey test,  $P < 0.001$ ), reaching similar values to naïve mice (One Way ANOVA,  $P = 0.413$ ). **g** OIP discrimination index reduced in Cort-mice ( $P < 0.001$ ) was increased after CNO administration. One Way ANOVA, Tukey test,  $P < 0.001$ . **h** OIP test scheme and representative spatial heatmaps of naïve and Cort-mice performing the task. Color code denotes accumulated time. **i** NOR discrimination index reduced in Cort-mice (One Way ANOVA, Tukey test,  $P = 0.001$ ) was rescued after CNO hM3Dq-astrocyte stimulation (One Way ANOVA, Holm-Sidak method,  $P = 0.021$ ). **j** Representative spatial heatmaps of naïve and Cort-mice during SR task. Color code denotes accumulated time. **k** Exploration time analyzed for naïve, Cort-mice and Cort-GFAP-hM3Dq mice during SR test showing that reduced levels of social interaction found in Cort-mice (One Way ANOVA, Holm-Sidak method,  $P = 0.004$ ) were reverted by CNO administration (One Way ANOVA, Dunn's method,  $P = 0.030$ ). **l** EPM exploration index in naïve GFAP-hM3Dq mice was reduced compared with control GFAP-mcherry naïve mice after CNO administration (3 mg/kg, i.p.). One Way ANOVA, Holm-Sidak,  $P = 0.007$ . **m** FST immobility time showed enhanced values in GFAP-hM3Dq mice. One Way ANOVA, Tukey Test,  $P = 0.002$ . **n, o, p** NOR discrimination index, OIP discrimination index and SR exploration time were reduced in GFAP-hM3Dq mice. One Way ANOVA, Dunn's Method,  $P < 0.001$  for NOR; Tukey Test,  $P = 0.011$  for OIP; Tukey Test,  $P = 0.015$  for SR. **q** Scheme of CNO and AIDA (5 mg/kg) i.p. administration in Cort-GFAP-hM3Dq mice. 1 and 2 denotes sequential i.p. injections. **r** FST immobility time showing increased values for Cort-GFAP-hM3Dq+AIDA mice (gray) compared with Cort-GFAP-hM3Dq mice (red, shown as median  $\pm$  range as reference). One Way ANOVA, Tukey test  $P = 0.008$ . **s, t, u** NOR discrimination index, OIP discrimination index and SR exploration time were reduced by previous administration of AIDA in Cort-GFAP-hM3Dq mice. One Way ANOVA, Dunn's Method,  $P = 0.020$  for NOR; Tukey test,  $P < 0.001$  for OIP; Dunn's Method,  $P = 0.015$  for SR. The center line in plots indicates the median, the top and bottom edges indicate the 25th and 75th percentiles, respectively, and the whiskers extend to the maximum and minimum data points. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

( $0.54 \pm 0.09$  and  $0.84 \pm 0.05$ , respectively;  $n \geq 5$  cells,  $n \geq 3$  mice; Paired  $t$  test,  $P \leq 0.010$ ) (Fig. 4h, i). MRS 2179 (10  $\mu\text{M}$ ), a selective antagonist of purinergic receptors type P2Y1, did not alter the 5-HT-mediated synaptic responses ( $1.08 \pm 0.04$ ,  $n = 6$  cells,  $n = 2$  mice; Paired  $t$  test,  $P = 0.086$ ) (Fig. 4h, i). Overall, these results suggest that 5-HT engaged astrocytic glutamate release through 5-HT<sub>2R</sub> activation, which further activated neuronal mGluR1 and NMDA receptors that contributed to the 5-HT-driven synaptic plasticity in mPFC (Extended Data Fig. 7j). In contrast, Cort-mice showed a reduced 5-HT-mediated astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  signaling, that failed to stimulate the release of glutamate (Fig. 2j, k), and correlated with an aberrant 5-HT mediated synaptic plasticity.

### Boosting astrocyte $\text{Ca}^{2+}$ signaling diminishes behavioral deficits in corticosterone-treated mice

In addition to the mood and affective responses, MDD also impairs cognitive abilities associated with attention, executive functions, learning and memory related processes [24, 117]. Alterations in astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signaling and gliotransmission have been shown to impact executive functions, such as fear-related behaviors, decision-making, and working memory tasks [118]. Hence, we investigated whether promoting the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in astrocytes might have significant impact on behavioral performance in Cort-mice. First, astrocytes from mPFC were activated by the selective expression of the designer receptors exclusively activated by designer drugs (DREADDs; AAV5-GFAP-hm3D(Gq)-mCherry) (Fig. 5a). The presence of the selective agonist clozapine-N-oxide (CNO, 1 mM) induced robust  $\text{Ca}^{2+}$  responses in transfected astrocytes from both naïve and Cort-mice (Fig. 5b, c), confirming their ability to engage  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in mPFC astrocytes. Next, we performed behavioral test on Cort-mice previously injected with AAV5-GFAP-hm3D(Gq)-mCherry in mPFC, and scores after 20 min of CNO injection (3 mg/kg i.p.) were analyzed (Fig. 5d–k; Extended Data Fig. 7a). Remarkably, selective activation of mPFC astrocytes by Gq-DREADDs ameliorated the altered rates of animal despair (from  $83.68 \pm 7.44$  s in Cort-mice to  $24.33 \pm 8.45$  s in Cort-GFAP-DREADDs mice,  $n = 15$  vs  $n = 9$ , respectively; One Way ANOVA, Tukey test;  $P < 0.001$ ) and anxiety levels found in Cort-mice (from  $0.04 \pm 0.01$  to  $0.28 \pm 0.08$ ; One Way ANOVA, Dunn's method;  $P = 0.003$ ) (Fig. 5d–f). Additionally, the cognitive abilities impaired by the Cort-treatment were

significantly improved after astrocytic Gq-DREADDs stimulation (from  $0.48 \pm 0.04$  to  $0.77 \pm 0.03$ , One Way ANOVA, Tukey test,  $P < 0.001$ , in OIP) (Fig. 5g–i) reaching similar values to those shown by naïve mice. Moreover, social interactions were also reestablished by selective activation of mPFC astrocytes in Cort-mice (from  $15.67 \pm 1.32\%$  to  $23.45 \pm 2.80\%$  exploration time; One Way ANOVA, Dunn's method;  $P = 0.030$ ) (Fig. 5j, k). Therefore, the manipulation of astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in mPFC is able to counteract the depressive-like behaviors shown by Cort-mice.

In contrast, CNO stimulation of mPFC astrocytes expressing Gq-DREADDs negatively affected mouse performance in naïve mice. Indeed, after CNO administration, naïve mice showed altered values in the behavioral tests, worsening the animal despair levels (from  $40.12 \pm 5.63$  to  $96.36 \pm 12.27$  s;  $n = 10$ ; One Way ANOVA, Tukey test  $P = 0.002$ ), anxiety levels (from  $0.14 \pm 0.02$  in naïve mice to  $0.07 \pm 0.02$  in naïve-DREADDs mice; One Way ANOVA, Holm-Sidak test;  $P = 0.007$ ), as well as cognitive (from  $0.64 \pm 0.03$  to  $0.35 \pm 0.05$  in NOR; One Way ANOVA, Tukey test;  $P < 0.001$ ), and social interaction abilities (from  $21.60 \pm 2.54\%$  to  $14.91 \pm 2.01\%$ ; One Way ANOVA, Tukey test;  $P = 0.015$ ) (Fig. 5l–p). Notably, these alterations were similar to those found by Cort-treatment. Control experiments using CNO in AAV5-GFAP-mCherry transfected mice showed no significant side effects [119], with similar cognitive performance to those naïve mice treated with saline or without viral injection manipulations (Extended Data Fig 7b–d). Additionally, the synaptic responses induced by Gq-DREADDs in astrocytes were evaluated in mPFC slices. CNO-driven astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signals induced potentiation of EPSC amplitude in both naïve and Cort-mice ( $1.62 \pm 0.22$  in naïve and  $1.39 \pm 0.14$  in Cort-mice,  $n \geq 6$  cells and  $n \geq 3$  mice; Paired  $t$  test;  $P < 0.05$ ) (Extended Data Fig. 7e–g). In line with 5-HT driven astrocyte activation (Fig. 4h), EPSC potentiation induced by Gq-DREADDs astrocytes was impaired by selective blockade of mGluR1 with LY367385 (50  $\mu\text{M}$ ) ( $0.98 \pm 0.06$  in naïve and  $0.94 \pm 0.13$  in Cort-mice,  $n \geq 6$  cells and  $n \geq 3$  mice; Paired  $t$  test;  $P > 0.05$ ) (Extended Data Fig. 7e–g). CNO also enhanced the frequency of the NMDA-mediated currents, SICs, supporting that ability of astrocytes to release glutamate that impacts neuronal membranes, and showing that the capability of astrocytes to release glutamate was not compromised by Cort-treatment.

According to previous data, a critical role of mGluR1 for executive functions has been described [70, 120]. Consistently, we

found that the systemic administration of AIDA ( $5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ i.p.}$ ), a selective antagonist of mGluR1, in naïve mice had a negative impact on behavior (Extended Data Fig. 8a–e). Remarkably, AIDA administration blocked the improved behavioral responses in Cort-mice after Gq-astrocytic stimulation with CNO (Fig. 5q–u), supporting the close relationship between astrocyte glutamatergic signaling and cognitive abilities [70]. In addition, the altered animal performance shown by naïve mice with astrocyte-expressing DREADDS after CNO stimulation was not modified by the presence of AIDA (Extended Data Fig. 8f–i). Overall, these data expose the highly regulated connection between astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signals and animal behavior.

## DISCUSSION

This study shows for the first time the abnormal neuron-astrocyte signaling in a mouse model that recapitulates depressive-like states, linking dysfunctional astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics and 5-HT-driven synaptic plasticity with behavioral impairments. According to previous studies [33, 55], we found that Cort-treatment in juvenile mice induced significant alterations in animal behavior mimicking some cognitive and mood features of MDD. Indeed, in vivo recordings in Cort-mice revealed an exacerbated astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  activity in mPFC with increased frequency and magnitude of  $\text{Ca}^{2+}$  events during open field exploratory activity. Remarkably, during social interactions, when mPFC activity is engaged [121, 122], astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signaling was largely impaired in Cort-mice, in line with weakened animal performance. However, the amplitude of astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  events during non-animated object explorations was similar in naïve and Cort-mice (Fig. 1g, h), according to comparable rates between groups for object explorations. These data uncover the specific engagement of mPFC astrocytic networks during social behaviors, and allow to hypothesize that the value of the explorations might have a significant impact in cortical astrocytes, which would require further investigation.

The serotonergic system plays a central role in the pathophysiology and treatment of depression [90]. Despite of the controversy [34], there is evidence supporting the link between low levels of 5-HT and MDD [103, 104]. Here, we confirmed the aberrant serotonergic neurotransmission in Cort-mice by using iSeroSnFR, a serotonergic sensor expressed in mPFC astrocytes. We have observed reduced levels of 5-HT released by DRN projections to mPFC in Cort-mice, which showed diminished astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  events amplitude, as well as gliotransmission impairments after 5-HT stimulation in mPFC. In fact, although Cort-mice showed enhanced gliotransmission in resting conditions, with an exacerbated glutamate release by astrocytes, we found reduced 5-HT engaged gliotransmission in these mice. These results suggest that alterations in astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signaling induced by depressive-like states have also significant impact on astrocyte-to-neuron signaling [123]. Nevertheless, alterations in  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics shown by Cort-astrocytes were not restricted to 5-HT-driven signaling. For instance, abnormal  $\text{Ca}^{2+}$  responsiveness was also found after ATP stimulation, indicating that dysfunctional astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  in depressive-like states may impact a broad neuron-astrocyte and glial-glia signaling pathways. It is important to note that giving the different experimental approaches and conditions to record astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signals from in vivo (Fig. 1) and ex vivo GCaMP6f transfected astrocytes (Fig. 2), with neuronal activity reduced in the presence of TTX, the obtained results have to be interpreted independently.

5-HT modulation of synaptic transmission and plasticity has been previously described as enhancing or reducing excitatory and inhibitory synaptic activity through the activation of different 5-HT receptor subtypes (5-HTRs) [108]. We found that 5-HT induced synaptic plasticity in layer 2/3 of mPFC principal neurons

by leading a transient depression of EPSCs. Such 5-HT-mediated plasticity required the activation of 5-HT1B receptors, which localize predominantly in axon terminals regulating neurotransmitter release [112] and also astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent signaling. Indeed, reducing astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  signaling by intracellular BAPTA-loading or by using *Ip3r2*<sup>-/-</sup> mice, 5-HT-driven synaptic plasticity was impaired and a sustained depression of EPSCs was found. Similar effects were observed by blocking 5-HT2Rs family, which also mediated the 5-HT-driven  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in astrocytes. Additionally, selective blockade of both mGluR1Rs and NMDARs resulted in long-lasting depression of 5-HT-induced synaptic plasticity. Overall, these results suggest a significant contribution of both astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signaling and astrocytic glutamatergic signaling for serotonergic synaptic actions.

5-HT2Rs family, including 5-HT2A, 5-HT2B and 5-HT2C, are highly expressed in different neuronal cell types, but also astrocytes [91]. Several evidences have related 5-HT2Rs with pathophysiology of MDD [124], 5-HT2A and 5-HT2C in mPFC play a critical role in the regulation of mood disorders, and their antagonism has been related to antidepressant features [125]. Although our data support the activation of 5-HT2A located at the astrocytic membranes, the contribution of presynaptic 5-HT2A to the 5-HT-driven synaptic plasticity cannot be discarded [126, 127]. In that scenario, our data suggest that, in addition to neuronal partners, astrocytic 5-HT2 receptors might be a potential target for specific antagonists contributing to the antidepressant effects. Overall, present data suggest that presynaptic 5-HT1B and putative astrocytic 5-HT2 receptors contributes to the 5-HT-mediated synaptic plasticity, revealing synergies between neuronal and astrocyte serotonergic receptors for synaptic plasticity with relevant functional outcomes.

In addition to the astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  signaling alterations found in this study, other critical changes have been found in astrocytes in depressive-like states [46]. In this context, altered expression of glutamate transporter-1 (GLT-1) was described in MDD patients [128], but also selective blockade of GLT-1 induced depressive-like behaviors in rodents [18], both affecting glutamatergic signaling. Considering the intracortical regional differences in behavioral responses found between infralimbic and prelimbic mPFC areas after GLT-1 blockade [18], further studies are required to uncover whether the astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signaling at specific intracortical structures has particular impact for depressive-like states.

Remarkably, hM3Dq-boosted astrocyte signaling in mPFC also impacts both intracortical connectivity and long-range projections from mPFC to subcortical brain regions [129], including hippocampus and amygdala, key brain areas involved in the spatial and memory tasks, and in anxiety-related behaviors, respectively. Here, we studied the role of astrocytic signaling in spatial exploration and novelty preference, as well as in mood behavior. We found that boosted astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  in prefrontal cortex overcomes depressive-like behavior. Indeed, selective hM3Dq activation of mPFC astrocytes in Cort-mice restored the behavioral scores to the naïve control values, including the social impairments. Downregulation of astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  signaling, based on transgenic *Ip3r2*<sup>-/-</sup> mice [130, 131], has been related with depressive-like behaviors; our data support these findings and provide the first evidence showing the restoring of cognitive abilities in Cort-mice by targeting astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  in mPFC. In line with ex vivo data, selective blockade of mGluR1 with AIDA injections occluded the beneficial actions of CNO for behavioral performance in Cort-mice, supporting the role of mGluR1 in cognitive functions [70, 120] and suggesting that selective glutamatergic signaling from astrocytes may inspire the observed effects (Extended Data Fig. 7j). The FST is frequently used to investigate depressive-like behaviors; however, immobility can also be interpreted as a passive coping strategy nowadays [132]. Regardless the interpretation, here we observed that selective CNO astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  stimulation in mPFC induced changes in swimming

strategies for both naïve and Cort-mice, shifting to higher immobility rates or restoring control values, respectively; which highlights the potential of mPFC astrocytes to modulate coping strategies.

The chronic corticosterone treatment approach used here has been found to recapitulate most of the endophenotypes related to depression based on the current Research Domain Criteria (RDoC) system [133], that is, avoidance of negative valence behaviors [33, 55], detachment of positive valence behaviors [30, 55] and impaired social and cognitive abilities [134–137], revealing it as a suitable experimental protocol to study behavioral consequences of chronic stress-related diseases. Different chronic stress protocols are also commonly used to study anxiety and depressive phenotypes in animal research, including unpredictable chronic mild stress protocol and social defeat [27, 28]. Whether astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signaling dysfunctions is a common feature of stress-related disorders or can be induced by different stress-related protocols needs to be resolved and addressed by future studies.

It has been reported that CNO is degraded into clozapine, a potent antipsychotic drug, which can potentially induce side effects [119]. Therefore, control experiments were performed in naïve expressing GFAP-mCherry viral vectors with CNO systemic application. These mice did not show significant behavioral changes in the analyzed tests (Extended Data Fig. 7b–d), suggesting that the reported behavioral effects of CNO were indeed attributed to selective stimulation of DREADDs-expressing astrocytes and not to direct modulation of dopamine or serotonergic receptors [119]. However, it cannot be excluded that clozapine could also be binding different molecular targets that are not considered in this study [138]. It is worth to mention, that similar hM3Dq strategy but in naïve mice was found harmful for animal behavior. In line with reported alterations of functional connectivity in prefrontal networks by CNO in healthy subjects [129], our data show that an increased astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in mPFC disrupted neuronal activity leading to a detrimental performance in mood and cognitive-related tasks. It has been shown that in the hippocampus, hM3Dq activation of astrocytes enhanced memory abilities enhancing excitatory synaptic transmission [139, 140], supporting a positive role of enhancing astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signaling for hippocampal-dependent contextual memory task [139]. In contrast, present data showed that activation of mPFC astrocytes, despite the potentiation of excitatory synaptic transmission (Extended Data Fig. 7e–g), failed to induce beneficial behavioral effects in control mice. In line with our results, experiments performed in control animals have shown that Gq-DREADDs in visual cortex lead to significant impairments in sleep-wake transitions, decreasing the percent time awake [141], and selective astrocyte activation in cingulate cortex triggers neuronal hyperactivity and increases BOLD functional connectivity between cortical and hippocampal regions, similar to the abnormal activity found in Alzheimer disease [129]. Then, these findings highlight the diversity of astrocyte-neuron circuits and propose that regional differences should be considered for the interpretation of behavioral outcomes when targeting astrocytes with Gq-DREADDs. It is important to note that present results were found in male mice, but sex differences have been described by functional studies in Cort-mice [31, 142–144]; therefore, an exhaustively comparative analysis between male and female mice will provide evidence of sex differences in  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics and 5-HT-driven astrocyte-neuron signaling in stress-related depressive-like behaviors.

Glutamatergic dysfunction and NMDARs play a critical role in psychiatric disorders, including MDD [145]. Thus, direct targeting of the NMDA receptor with ketamine [146] results in faster antidepressant effects compared with classical antidepressants, including selective serotonin reuptake inhibitors, whose effects might take several weeks in MDD patients. Here, we showed that

targeting astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in mPFC induced fast antidepressant effects in Cort-mice, which might be considered as a potential target for antidepressant drugs. As for the case of ketamine [147], the overactivation of astrocytic  $\text{Ca}^{2+}$  resulted in a significant increase of depressive symptoms in naïve mice. Thus, stimulating astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signaling does not produce beneficial effects in healthy control subjects. These findings will need further exploration for understanding the mechanisms underlying hM3Dq-astrocyte driven dysfunctional cortical networks and animal behavior in healthy conditions. Our study was focused on the acute response to astrocyte activation, and longitudinal studies would be required to investigate long-lasting effects of CNO-stimulated astrocytes in Cort-mice.

Overall, the present study reveals the critical role of astrocytes and the tight control of their  $\text{Ca}^{2+}$  levels for the top-down regulation of executive functions driven by the mPFC in health and stress-induced depressive-like phenotypes [130]. Moreover, our data highlight the potential value of astrocytes as targets for developing improved treatments for these neurological disorders.

## DATA AVAILABILITY

All data generated or analyzed during this study are either included in this published article or are available from the corresponding author upon reasonable request. Source data are provided with this paper.

## CODE AVAILABILITY

Analyses used in this study are largely standard approaches for this type of data. The code that supports these findings is available upon request from the corresponding author.

## REFERENCES

- Perea G, Araque A. Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science*. 2007;1083–6317.
- Henneberger C, Papouin T, Oliet SHR, Rusakov DA. Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature*. 2010;463:232–6.
- Volterra A, Liaudet N, Savtchouk I. Astrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  signalling: an unexpected complexity. *Nat Rev Neurosci*. 2014;15:327–35.
- Hamilton NB, Attwell D. Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? *Nat Rev Neurosci*. 2010;11:227–38.
- Santello M, Toni N, Volterra A. Astrocyte function from information processing to cognition and cognitive impairment. *Nat Neurosci*. 2019;22:154–66.
- Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Oliet SHR, Robitaille R, Volterra A. Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron*. 2014;81:728–39.
- Oliveira JF, Sardinha VM, Guerra-Gomes S, Araque A, Sousa N. Do stars govern our actions? Astrocyte involvement in rodent behavior. *Trends Neurosci*. 2015;38:535–49.
- Carlsen EMM, Falk S, Skupio U, Robin L, Pagano Zottola AC, Marsicano G, et al. Spinal astroglial cannabinoid receptors control pathological tremor. *Nat Neurosci*. 2021;24:658–66.
- Perea G, Yang A, Boyden ES, Sur M. Optogenetic astrocyte activation modulates response selectivity of visual cortex neurons in vivo. *Nat Commun*. 2014;5:1–12.
- Mu Y, Bennett DV, Rubinov M, Narayan S, Yang CT, Tanimoto M, et al. Glia accumulate evidence that actions are futile and suppress unsuccessful behavior. *Cell*. 2019;178:27–43.e19.
- Li Y, Li L, Wu J, Zhu Z, Feng X, Qin L, et al. Activation of astrocytes in hippocampus decreases fear memory through adenosine A1 receptors. *Elife*. 2020;9:1–25.
- Poskanzer KE, Molofsky AV. Dynamism of an astrocyte in vivo: perspectives on identity and function. *Annu Rev Physiol*. 2018;80:143–57.
- Verkhatsky A, Parpura V, Pekna M, Pekny M, Sofroniew M. Glia in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Biochem Soc Trans*. 2014;42:1291–301.
- Pearlmutter P, DeRose G, Samson C, Linehan N, Cen Y, Begdache L, et al. Sweat and saliva cortisol response to stress and nutrition factors. *Sci Rep*. 2020;10:1–11.
- Pariante CM, Lightman SL. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends Neurosci*. 2008;31:464–8.



16. Lu CL, Ren J, Mo JW, Fan J, Guo F, Chen LY, et al. Glucocorticoid receptor-dependent astrocytes mediate stress vulnerability. *Biol Psychiatry*. 2022;92:204–15.
17. Murphy-Royal C, Johnston AD, Boyce AKJ, Diaz-Castro B, Institoris A, Perringod G, et al. Stress gates an astrocytic energy reservoir to impair synaptic plasticity. *Nat Commun*. 2020;11:2014.
18. Fullana MN, 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;67:1122–37.
19. Gosselin RD, Gibney S, O'Malley D, Dinan TG, Cryan JF. Region specific decrease in glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the brain of a rat model of depression. *Neuroscience*. 2009;159:915–25.
20. McEwen BS. Protection and damage from acute and chronic stress: allostasis and allostatic overload and relevance to the pathophysiology of psychiatric disorders. *Ann NY Acad Sci*. 2004;1032:1–7.
21. Holsboer F, Ising M. Stress hormone regulation: biological role and translation into therapy. *Annu Rev Psychol*. 2010;61:81–109.
22. Zheng Z, Guo C, Li M, Yang L, Liu P, Zhang X, et al. Hypothalamus-habenula potentiation encodes chronic stress experience and drives depression onset. *Neuron*. 2022;110:1400–15.e6.
23. Uekermann J, Channon S, Lehmkaemper C, Abdel-Hamid M, Vollmoeller W, Daum I. Executive function, mentalizing and humor in major depression. *J Int Neuropsychol Soc*. 2008;14:55–62. <https://doi.org/10.1017/S1355617708080016>
24. Beblo T, Sinnamon G, Baune BT. Specifying the neuropsychology of affective disorders: clinical, demographic and neurobiological factors. *Neuropsychol Rev*. 2011;21:337–59.
25. Spear LP. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev*. 2000;24:417–63.
26. Casey BJ, Jones RM. Neurobiology of the adolescent brain and behavior: implications for substance use disorders. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2010;49:1189–201.
27. Willner P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: history, evaluation and usage. *Neurobiol Stress*. 2016;6:78–93.
28. Golden SA, Covington HE, Berton O, Russo SJ. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. *Nat Protoc*. 2011;6:1183–91.
29. Moda-Sava RN, Murdock MH, Parekh PK, Fetcho RN, Huang BS, Huynh TN, et al. Sustained rescue of prefrontal circuit dysfunction by antidepressant-induced spine formation. *Science*. 2019;364:eaat8078.
30. Dieterich A, Srivastava P, Sharif A, Stech K, Floeder J, Yohn SE, et al. Chronic corticosterone administration induces negative valence and impairs positive valence behaviors in mice. *Transl Psychiatry*. 2019;9:337.
31. Bertholomey ML, Nagarajan V, Smith DM, Torregrossa MM. Sex- and age-dependent effects of chronic corticosterone exposure on depressive-like, anxiety-like, and fear-related behavior: Role of amygdala glutamate receptors in the rat. *Front Behav Neurosci*. 2022;16:950000.
32. Levinstein MR, Samuels BA. Mechanisms underlying the antidepressant response and treatment resistance. *Front Behav Neurosci*. 2014;8:208.
33. Gourley SL, Taylor JR. Recapitulation and reversal of a persistent depression-like syndrome in rodents. *Curr Protoc Neurosci*. 2009;49:9.32.1–9.32.11.
34. Moncrieff J, Cooper RE, Stockmann T, Amendola S, Hengartner MP, Horowitz MA. The serotonin theory of depression: a systematic umbrella review of the evidence. *Mol Psychiatry*. 2022;1–14.
35. Delgado PL. Depression: the case for a monoamine deficiency. *J Clin Psychiatry*. 2000;61:4165.
36. Réus GZ, Abelaira HM, Tuon T, Titus SE, Ignácio ZM, Rodrigues ALS, et al. Glutamatergic NMDA receptor as therapeutic target for depression. *Adv Protein Chem Struct Biol* 2016;103:169–202.
37. Kadriu B, Musazzi L, Johnston JN, Kalynchuk LE, Caruncho HJ, Popoli M, et al. Positive AMPA receptor modulation in the treatment of neuropsychiatric disorders: A long and winding road. *Drug Discov Today*. 2021;26:2816–38.
38. Fogaça MV, Duman RS. Cortical GABAergic dysfunction in stress and depression: new insights for therapeutic interventions. *Front Cell Neurosci*. 2019;13:87.
39. Anacker C, Zunsain PA, Carvalho LA, Pariante CM. The glucocorticoid receptor: pivot of depression and of antidepressant treatment? *Psychoneuroendocrinology* 2011;36:415–25.
40. Yohn CN, Gergues MM, Samuels BA. The role of 5-HT receptors in depression. *Mol Brain*. 2017;10:1–12.
41. Belujon P, Grace AA. Dopamine system dysregulation in major depressive disorders. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2017;20:1036–46.
42. Al-Harbi KS. Treatment-resistant depression: therapeutic trends, challenges, and future directions. *Patient Prefer Adherence*. 2012;6:369–88.
43. Cobb JA, O'Neill K, Milner J, Mahajan J, Lawrence TJ, May WL, et al. Density of GFAP-immunoreactive astrocytes is decreased in left hippocampi in major depressive disorder HHS Public Access. *Neuroscience*. 2016;316:209–20.
44. Gittins RA, Harrison PJ. A morphometric study of glia and neurons in the anterior cingulate cortex in mood disorder. *J Affect Disord*. 2011;133:328–32.
45. Arora P, Sagar R, Mehta M, Pallavi P, Sharma S, Mukhopadhyay AK. Serum S100B levels in patients with depression. *Indian J Psychiatry*. 2019;61:70.
46. Wang Q, Jie W, Liu JH, Yang JM, Gao TM. An astroglial basis of major depressive disorder? An overview. *Glia*. 2017;65:1227–50.
47. Banasr M, Duman RS. Glial loss in the prefrontal cortex is sufficient to induce depressive-like behaviors. *Biol Psychiatry*. 2008;64:863–70.
48. Sun JD, Liu Y, Yuan YH, Li J, Chen NH. Gap junction dysfunction in the prefrontal cortex induces depressive-like behaviors in rats. *Neuropsychopharmacology* 2012;37:1305–20.
49. John CS, Smith KL, Van't Veer A, Gompf HS, Carlezon WA, Cohen BM, et al. Blockade of astrocytic glutamate uptake in the prefrontal cortex induces anhedonia. *Neuropsychopharmacology*. 2012;37:2467–75.
50. Cui Y, Yang Y, Ni Z, Dong Y, Cai G, Foncelle A, et al. Astroglial Kir4.1 in the lateral habenula drives neuronal bursts in depression. *Nature*. 2018;554:323–7.
51. Koizumi S. Glial purinergic signals and psychiatric disorders. *Front Cell Neurosci*. 2022;15:543.
52. Bittar TP, Labonté B. Functional contribution of the medial prefrontal circuitry in major depressive disorder and stress-induced depressive-like behaviors. *Front Behav Neurosci*. 2021;15:699592.
53. Williams LM. Precision psychiatry: a neural circuit taxonomy for depression and anxiety. *Lancet Psychiatry*. 2016;3:472–80.
54. Li X, Zima AV, Sheikh F, Blatter LA, Chen J. Endothelin-1-induced arrhythmogenic  $Ca^{2+}$  signaling is abolished in atrial myocytes of inositol-1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) receptor type 2-deficient mice. *Circ Res*. 2005;96:1274–81.
55. Ferrés-Coy A, Galofré M, Pilar-Cuellar F, Vidal R, Paz V, Ruiz-Bronchal E, et al. Therapeutic antidepressant potential of a conjugated siRNA silencing the serotonin transporter after intranasal administration. *Mol Psychiatry*. 2015;21:328–38.
56. Kallioikoski O, Jellestad FK, Murison R. A systematic review of studies utilizing hair glucocorticoids as a measure of stress suggests the marker is more appropriate for quantifying short-term stressors. *Sci Rep*. 2019;9:11997.
57. Paxinos G, Franklin K. Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Compact The Coronal Plates and Diagrams. Academic Press; 2019.
58. Matthews GA, Nieh EH, vander Weele CM, Halbert SA, Pradhan RV, Yosafat AS, et al. Dorsal raphe dopamine neurons represent the experience of social isolation. *Cell*. 2016;164:617–31.
59. Mederos S, Sánchez-Ruiz A, Perea G. Protocol to downregulate GABAergic-astrocyte signaling via astrocyte-selective ablation of GABAB receptor in adult mice. *STAR Protoc*. 2022;3:101667.
60. Ting JT, Daigle TL, Chen Q, Feng G. Acute brain slice methods for adult and aging animals: application of targeted patch clamp analysis and optogenetics. *Methods. Mol Biol*. 2014;1183:221–42.
61. Gómez-Gonzalo M, Martín-Fernández M, Martínez-Murillo R, Mederos S, Hernández-Vivanco A, Jamison S, et al. Neuron-astrocyte signaling is preserved in the aging brain. *Glia*. 2017;65:569–80.
62. Kim CK, Yang SJ, Pichamoorthy N, Young NP, Kauvar I, Jennings JH, et al. simultaneous fast measurement of circuit dynamics at multiple sites across the mammalian brain. *Nat Methods*. 2016;13:325.
63. Lerner TN, Shilyansky C, Davidson TJ, Evans KE, Beier KT, Zalocusky KA, et al. Intact-brain analyses reveal distinct information carried by SNc dopamine subcircuits. *Cell*. 2015;162:635–47.
64. Wang Y, Delrosso NV. Accurate quantification of astrocyte and neurotransmitter fluorescence dynamics for single-cell and population-level physiology. *Nat Neurosci*. 2019;22:1936–44.
65. Gunaydin LA, Grosenick L, Finkelstein JC, Kauvar IV, Fenno LE, Adhikari A, et al. Natural neural projection dynamics underlying social behavior. *Cell*. 2014;157:1535–51.
66. Matthews GA, Nieh EH, Vander Weele CM, Halbert SA, Pradhan RV, Yosafat AS, et al. Dorsal raphe dopamine neurons represent the experience of social isolation. *Cell*. 2016;164:617–31.
67. Perea G, Gómez R, Mederos S, Covelo A, Ballesteros JJ, Schlosser L, et al. Activity-dependent switch of gabaergic inhibition into glutamatergic excitation in astrocyte-neuron networks. *Elife*. 2016;5:e20362.
68. Perea G, Araque A. Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *J Neurosci*. 2005;25:2192–203.
69. Navarrete M, Araque A. Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron*. 2008;57:883–93.
70. Mederos S, Sánchez-Puelles C, Esparza J, Valero M, Ponomarenko A, Perea G. GABAergic signaling to astrocytes in the prefrontal cortex sustains goal-directed behaviors. *Nat Neurosci*. 2020;24:82–92.

71. Bogdanova OV, Kanekar S, D'Anci KE, Renshaw PF. Factors influencing behavior in the forced swim test. *Physiol Behav.* 2013;118:227–39.
72. Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharm.* 1978;47:379–91.
73. Bailey KR, Crawley JN. Anxiety-related behaviors in mice. In J. J. Buccafusco (ed), *Methods of behavioral analysis in neuroscience.* 2009:77–101.
74. Barker GR, Warburton EC. Object-in-place associative recognition memory depends on glutamate receptor neurotransmission within two defined hippocampal-cortical circuits: a critical role for AMPA and NMDA receptors in the hippocampus, perirhinal, and prefrontal cortices. *Cereb Cortex.* 2015;25:472–81. <https://doi.org/10.1093/cercor/bht245>
75. Ennaceur A. One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behav Brain Res.* 2010;215:244–54.
76. Sánchez-Puelles C, Calleja-Felipe M, Ouro A, Bougamra G, Arroyo A, Diez I, et al. PTEN activity defines an axis for plasticity at cortico-amygdala synapses and influences social behavior. *Cereb Cortex.* 2020;30:505–24.
77. Chou A, Morganti JM, Rosi S. Frontal lobe contusion in mice chronically impairs prefrontal-dependent behavior. *PLoS One.* 2016;11:e0151418 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151418>
78. Miranda R, Nagapin F, Bozon B, Laroche S, Aubin T, Vaillend C. Altered social behavior and ultrasonic communication in the dystrophin-deficient mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Mol Autism.* 2015;6:1–17.
79. Park G, Ryu C, Kim S, Jeong SJ, Koo JW, Lee YS, et al. Social isolation impairs the prefrontal-nucleus accumbens circuit subserving social recognition in mice. *Cell Rep.* 2021;35:109104.
80. Mariotti L, Losi G, Lia A, Melone M, Chiavegato A, Gómez-Gonzalo M, et al. Interneuron-specific signaling evokes distinctive somatostatin-mediated responses in adult cortical astrocytes. *Nat Commun.* 2018;9:1–14.
81. Pohl J, Olmstead MC, Wynne-Edwards KE, Harkness K, Menard JL. Repeated exposure to stress across the childhood-adolescent period alters rats' anxiety- and depression-like behaviors in adulthood: The importance of stressor type and gender. *Behav Neurosci.* 2007;121:462–74.
82. Isgor C, Kabbaj M, Akil H, Watson SJ. Delayed effects of chronic variable stress during peripubertal-juvenile period on hippocampal morphology and on cognitive and stress axis functions in rats. *Hippocampus.* 2004;14:636–48.
83. Iñiguez SD, Aubry A, Riggs LM, Alipio JB, Zanca RM, Flores-Ramirez FJ, et al. Social defeat stress induces depression-like behavior and alters spine morphology in the hippocampus of adolescent male C57BL/6 mice. *Neurobiol Stress.* 2016;5:54–64.
84. Shahanoor Z, Sultana R, Baker MR, Romeo RD. Neuroendocrine stress reactivity of male C57BL/6 N mice following chronic oral corticosterone exposure during adulthood or adolescence. *Psychoneuroendocrinology.* 2017;86:218–24.
85. Elmer T, Stadtfeld C. Depressive symptoms are associated with social isolation in face-to-face interaction networks. *Sci Rep.* 2020;10:1444 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58297-9>
86. Berger S, Gureczny S, Reisinger SN, Horvath O, Pollak DD. Effect of chronic corticosterone treatment on depression-like behavior and sociability in female and male C57BL/6 N mice. *Cells.* 2019;8:1018 <https://doi.org/10.3390/cells8091018>
87. Dombeck DA, Khabbaz AN, Collman F, Adelman TL, Tank DW. Imaging large-scale neural activity with cellular resolution in awake, mobile mice. *Neuron.* 2007;56:43–57.
88. Åbjørnsbråten KS, Skaaraas GHES, Cunén C, Bjørnstad DM, Binder KMG, Bojarskaite L, et al. Impaired astrocytic Ca<sup>2+</sup> signaling in awake-behaving Alzheimer's disease transgenic mice. *Elife* 2022;11:e75055.
89. King CM, Bohmbach K, Minge D, Delekate A, Zheng K, Reynolds J, et al. Local resting Ca<sup>2+</sup> controls the scale of astroglial Ca<sup>2+</sup> signals. *Cell Rep.* 2020;30:3466–77.e4.
90. Liu Y, Zhao J, Fan X, Guo W. Dysfunction in serotonergic and noradrenergic systems and somatic symptoms in psychiatric disorders. *Front Psychiatry.* 2019;10:286.
91. Verkhatsky A, Parpura V, Scuderi C, Li B. Astroglial serotonin receptors as the central target of classic antidepressants. *Adv Neurobiol.* 2021;26:317.
92. Cotrina ML, Lin JHC, López-García JC, Naus CCG, Nedergaard M. ATP-mediated glia signaling. *J Neurosci.* 2000;20:2835–44.
93. Pascual O, Casper KB, Kubera C, Zhang J, Revilla-Sanchez R, Sul JY, et al. Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science.* 2005;310:113–6.
94. Perea G, Sur M, Araque A. Neuron-glia networks: integral gear of brain function. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:1–8.
95. Risher WC, Eroglu C. Thrombospondins as key regulators of synaptogenesis in the central nervous system. *Matrix Biol.* 2012;31:170–7.
96. Parri HR, Gould TM, Crunelli V. Spontaneous astrocytic Ca<sup>2+</sup> oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nat Neurosci.* 2001;4:803–12.
97. Wu C, Singh SK, Dias P, Kumar S, Mann DMA. Activated astrocytes display increased 5-HT<sub>2a</sub> receptor expression in pathological states. *Exp Neurol.* 1999;158:529–33.
98. Li B, Zhang S, Li M, Hertz L, Peng L. Serotonin increases ERK1/2 phosphorylation in astrocytes by stimulation of 5-HT<sub>2B</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors. *Neurochem Int.* 2010;57:432–9.
99. Miner LAH, Backstrom JR, Sanders-Bush E, Sesack SR. Ultrastructural localization of serotonin<sub>2A</sub> receptors in the middle layers of the rat prelimbic prefrontal cortex. *Neuroscience.* 2003;116:107–17.
100. Srinivasan R, Huang BS, Venugopal S, Johnston AD, Chai H, Zeng H, et al. Ca<sup>2+</sup> signaling in astrocytes from *lpr3r2*  $\text{---/---}$  mice in brain slices and during startle responses in vivo. *Nat Neurosci.* 2015;18:708–17.
101. Bayraktar OA, Bartels T, Holmqvist S, Kleshchevnikov V, Martirosyan A, Poliodakis D, et al. Astrocyte layers in the mammalian cerebral cortex revealed by a single-cell in situ transcriptomic map. *Nat Neurosci.* 2020;23:500–9.
102. Kristiansen K, Dahl SG. Molecular modeling of serotonin, ketanserin, ritanserin and their 5-HT<sub>2C</sub> receptor interactions. *Eur J Pharm.* 1996;306:195–210.
103. Underwood MD, Kassir SA, Bakalian MJ, Galfalvy H, Dwork AJ, Mann JJ, et al. Serotonin receptors and suicide, major depression, alcohol use disorder and reported early life adversity. *Transl Psychiatry.* 2018;8:279.
104. Wisłowska-Stanek A, Kołowska K, Maciejak P, Faron-Górecka A. Neurobiological basis of increased risk for suicidal behaviour. *Cells.* 2021;10:2519 <https://doi.org/10.3390/cells10102519>
105. Sachs BD, Ni JR, Caron MG. Brain 5-HT deficiency increases stress vulnerability and impairs antidepressant responses following psychosocial stress. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015;112:2557–62.
106. Wan J, Peng W, Li X, Qian T, Song K, Zeng J, et al. A genetically encoded sensor for measuring serotonin dynamics. *Nat Neurosci.* 2021;24:746–52.
107. Lee MT, Peng WH, Kan HW, Wu CC, Wang DW, Ho YC. Neurobiology of depression: chronic stress alters the glutamatergic system in the brain-focusing on AMPA receptor. *Biomedicine* 2022;10:1005.
108. Lesch KP, Waider J. Serotonin in the modulation of neural plasticity and networks: implications for neurodevelopmental disorders. *Neuron* 2012;76:175–91.
109. Olivier B. Serotonin: a never-ending story. *Eur J Pharm.* 2015;753:2–18.
110. Cook SC, Wellman CL. Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *J Neurobiol.* 2004;60:236–48.
111. Radley JJ, Rocher AB, Rodriguez A, Ehlenberger DB, Dammann M, McEwen BS, et al. Altered stress alters dendritic spine morphology in the rat medial prefrontal cortex. *J Comp Neurol.* 2008;507:1141–50.
112. Kjaerby C, Athilingam J, Robinson SE, lafrati J, Sohail VS. Serotonin 1B receptors regulate prefrontal function by gating callosal and hippocampal inputs. *Cell Rep.* 2016;17:2882–90.
113. Tian Z, Yamanaka M, Bernabucci M, Zhao MG, Zhuo M. Characterization of serotonin-induced inhibition of excitatory synaptic transmission in the anterior cingulate cortex. *Mol Brain.* 2017;10:21.
114. Allen NJ, Eroglu C. Cell biology of astrocyte-synapse interactions. *Neuron.* 2017;96:697–708.
115. Celada P, Victoria Puig M, Artigas F. Serotonin modulation of cortical neurons and networks. *Front Integr Neurosci.* 2013;7:25.
116. Ye Q, Zhang X. Serotonin activates paraventricular thalamic neurons through direct depolarization and indirect disinhibition from zona incerta. *J Physiol.* 2021;599:4883–4900.
117. Benke T, Marksteiner J, Ruepp B, Weiss EM, Zamarian L. Decision making under risk in patients suffering from schizophrenia or depression. *Brain Sci.* 2021;11:1178.
118. Nagai J, Yu X, Papouin T, Cheong E, Freeman MR, Monk KR, et al. Behaviorally consequential astrocytic regulation of neural circuits. *Neuron* 2021;109:576–96.
119. Gomez JL, Bonaventura J, Lesniak W, Mathews WB, Syta-Shah P, Rodriguez LA, et al. Chemogenetics revealed: DREADD occupancy and activation via converted clozapine. *Science.* 2017;357:503–7.
120. Sun H, Neugebauer V. mGluR1, but not mGluR5, activates feed-forward inhibition in the medial prefrontal cortex to impair decision making. *J Neurophysiol.* 2011;106:960–73.
121. Schaefer HS, Putnam KM, Benca RM, Davidson RJ. Event-related functional magnetic resonance imaging measures of neural activity to positive social stimuli in pre- and post-treatment depression. *Biol Psychiatry.* 2006;60:974–86.
122. Smoski MJ, Felder J, Bizzell J, Green SR, Ernst M, Lynch TR, et al. fMRI of alterations in reward selection, anticipation, and feedback in major depressive disorder. *J Affect Disord.* 2009;118:69–78.
123. Fullana MN, 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;29:1288–94.
124. Carhart-Harris RL, Nutt DJ. Serotonin and brain function: a tale of two receptors. *J Psychopharmacol.* 2017;31:1091–120.
125. Nocjar C, Alex KD, Sonneborn A, Abbas AI, Roth BL, Pehek EA. Serotonin-2C and -2a receptor co-expression on cells in the rat medial prefrontal cortex. *Neuroscience* 2015;297:22–37.

126. Aghajanian GK, Marek GJ. Serotonin induces excitatory postsynaptic potentials in apical dendrites of neocortical pyramidal cells. *Neuropharmacology* 1997;36:589–99.
127. Barre A, Berthouix C, De Bundel D, Valjent E, Bockaert J, Marin P, et al. Presynaptic serotonin 2A receptors modulate thalamocortical plasticity and associative learning. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113:E1382–E1391.
128. Choudary PV, Molnar M, Evans SJ, Tomita H, Li JZ, Vawter MP, et al. Altered cortical glutamatergic and GABAergic signal transmission with glial involvement in depression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:15653–15658.
129. Shah D, Gsell W, Wahis J, Luckett ES, Jamouille T, Vermaercke B, et al. Astrocyte calcium dysfunction causes early network hyperactivity in Alzheimer's disease. *Cell Rep*. 2022;40:111280.
130. Cao X, Li LP, Wang Q, Wu Q, Hu HH, Zhang M, et al. Astrocyte-derived ATP modulates depressive-like behaviors. *Nat Med*. 2013;19:773–7.
131. Liu J, Mo J-W, Wang X, An Z, Zhang S, Zhang C-Y, et al. Astrocyte dysfunction drives abnormal resting-state functional connectivity in depression. *Sci Adv*. 2022;8:eabo2098.
132. Molendijk ML, de Kloet ER. Coping with the forced swim stressor: current state-of-the-art. *Behavioural Brain Res*. 2019;364:1–10.
133. Anderzhanova E, Kirmeier T, Wotjak CT. Animal models in psychiatric research: The RDoC system as a new framework for endophenotype-oriented translational neuroscience. *Neurobiol Stress*. 2017;7:47–56.
134. Zhao S, Xu X, Xie G, Zhang T. Chronic corticosterone exposure impairs emotional regulation and cognitive function through disturbing neural oscillations in mice. *Behav Brain Res*. 2022;434:114030.
135. Lui E, Salim M, Chahal M, Puri N, Marandi E, Quadriatero J, et al. Chronic corticosterone-induced impaired cognitive flexibility is not due to suppressed adult hippocampal neurogenesis. *Behav Brain Res*. 2017;332:90–98.
136. Athira KV, Madhana RM, Bais AK, Singh VB, Malik A, Sinha S, et al. Cognitive improvement by vorinostat through modulation of endoplasmic reticulum stress in a corticosterone-induced chronic stress model in mice. *ACS Chem Neurosci*. 2020;11:2649–57.
137. Yang Y, Mourir A, Lu Q, Kunisawa K, Kubota H, Hasegawa M, et al. Loureirin C and xanthoceraside prevent abnormal behaviors associated with downregulation of brain derived neurotrophic factor and AKT/mTOR/CREB signaling in the prefrontal cortex induced by chronic corticosterone exposure in mice. *Neurochem Res*. 2022;47:2865–79.
138. Ozawa A, Arakawa H. Chemogenetics drives paradigm change in the investigation of behavioral circuits and neural mechanisms underlying drug action. *Behav Brain Res*. 2021;406:113234.
139. Adamsky A, Kol A, Kreisel T, Doron A, Ozeri-Engelhard N, Melcer T, et al. Astrocytic activation generates de novo neuronal potentiation and memory enhancement. *Cell* 2018;174:59–71.e14.
140. Mederos S, Hernández-Vivanco A, Ramírez-Franco J, Martín-Fernández M, Navarrete M, Yang A, et al. Melanopsin for precise optogenetic activation of astrocyte-neuron networks. *Glia* 2019;67:915–34.
141. Vaidyanathan TV, Collard M, Yokoyama S, Reitman ME, Poskanzer KE. Cortical astrocytes independently regulate sleep depth and duration via separate GPCR pathways. *Elife* 2021;10:e63329.
142. Bittar TP, Pelaez MC, Hernandez Silva JC, Quessy F, Lavigne AA, Morency D, et al. Chronic stress induces sex-specific functional and morphological alterations in corticoaccumbal and corticostriatal pathways. *Biol Psychiatry*. 2021;90:194–205.
143. Patel SD, Cameron LP, Olson DE. Sex-specific social effects on depression-related behavioral phenotypes in mice. *Life* 2021;11:1327.
144. Anderson RM, Johnson SB, Lingg RT, Hinz DC, Romig-Martin SA, Radley JJ. Evidence for similar prefrontal structural and functional alterations in male and female rats following chronic stress or glucocorticoid exposure. *Cereb Cortex*. 2020;30:353–70.
145. Li CT, Yang KC, Lin WC. Glutamatergic dysfunction and glutamatergic compounds for major psychiatric disorders: evidence from clinical neuroimaging studies. *Front Psychiatry*. 2019;10:767.
146. Berman RM, Cappiello A, Anand A, Oren DA, Heninger GR, Charney DS, et al. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry*. 2000;47:351–4.
147. Nugent AC, Ballard ED, Gould TD, Park LT, Moaddel R, Brutsche NE, et al. Ketamine has distinct electrophysiological and behavioral effects in depressed and healthy subjects. *Mol Psychiatry*. 2018;24:1040–52.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the entire Perea lab for their support. We are grateful to for critical reading to E. Martin, M. Navarrete and S. Mederos. We are also grateful to Matthew Holt (Universidade do Porto) for providing the *Aldh1l1*-EGFP mice.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

CG-A performed all of the experiments with help from AS-R, JE, CS-P, LA, JR-F, DG and FK. CG-A and GP interpreted data. All the authors discussed the data. GP wrote the paper with inputs from all authors. GP provided resources and funding.

## FUNDING

This work was supported by PID2019-106579RB-I00 and PID2022-142617NB-I00 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and by “ERDF A way of making Europe” to G.P., by PLEC2022-009385 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and by “NextGeneration EU/PRTR” to GP; La Marató TV3 Foundation #225619 to GP. BES-2017-080303 to CG-A and PRE2020-092999 to AS-R by MCIN/AEI/FEDER,UE. PEJ-2020-AI/BMD-18675 to LA. Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) SFB 894, SFB 1158 and SPP 1757 to FK.

## COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

## ADDITIONAL INFORMATION

**Supplementary information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41380-023-02269-8>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to Gertrudis Perea.

**Reprints and permission information** is available at <http://www.nature.com/reprints>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2023



