

Confirmación de la presencia de células serotoninérgicas en la corteza cerebral fetal en cultivos e *in situ*

Alfonso Boyzo-Montes de Oca,¹ Gabriel Manjarrez-Gutiérrez^{2,3*} y Jorge Hernández-Rodríguez⁴

¹Laboratorio de Neuroquímica, Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México; ²Unidad de Investigación en Enfermedades Neurológicas, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México; ³Laboratorio de Patología Molecular, Unidad de Investigación Biomolecular, Hospital de Cardiología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México; ⁴Centro de Comunicación Prenatal, Querétaro, Querétaro. México

Resumen

Antecedentes: La aparición temprana de serotonina en el cerebro fetal y sus efectos en la morfogénesis cerebral apoyan su papel neurotrófico. **Objetivo:** Determinar la presencia de células serotoninérgicas y la expresión de triptófano-5-hidroxilasa (TPH), 5-hidroxitriptamina (5-HT), transportador de serotonina (SERT), receptor 5-HT_{1A} y Pet-1 durante el desarrollo de la corteza cerebral, tanto *in situ* como en cultivo de tejidos. **Material y métodos:** Se realizó estudio observacional descriptivo en ratas Wistar preñadas. La presencia del tapón se consideró el inicio de la gestación; en los días 13, 16 y 17 se practicaron cesáreas para obtener los fetos e inmediatamente se disecaron los cerebros para identificar células serotoninérgicas, TPH, 5-HT, SERT, 5-HT_{1A} y Pet-1 en cultivo de tejido e *in situ* mediante inmunomarcaje detectado en un microscopio confocal. **Resultados:** Células y terminales serotoninérgicas fueron observadas en el mesencéfalo el día 17 de gestación y en cocultivos de neopallio los días 13 y 16. También se observaron células inmunopositivas a TPH, 5-HT, SERT y Pet-1 en el neopallio en el día 12 del cultivo. **Conclusiones:** Se confirmó la presencia de células serotoninérgicas y otros elementos del sistema serotoninérgico en la corteza cerebral temprana, la cual puede ser transitoria y participar en los procesos de maduración cortical durante el desarrollo cerebral.

PALABRAS CLAVE: Corteza cerebral. Neuronas serotoninérgicas. Serotonina. Triptófano-5-hidroxilasa.

Confirmation of the presence of serotonergic cells in the fetal cerebral cortex in cultures and *in situ*

Abstract

Background: Early appearance of serotonin in the fetal brain and its effects on brain morphogenesis support its neurotrophic role. **Objective:** To determine the presence of serotonergic cells and the expression of tryptophan-5-hydroxylase (TPH), 5-hydroxytryptamine (5-HT), serotonin transporter (SERT), 5-HT_{1A} receptor and Pet-1 during the development of the cerebral cortex, both *in situ* and in tissue cultures. **Material and methods:** A descriptive, observational study was carried out in pregnant Wistar rats. The presence of the plug was regarded as the beginning of gestation. On days 13, 16 and 17, cesarean sections were performed to obtain the fetuses, and the brains were then immediately dissected to identify the presence of serotonergic cells, TPH, 5-HT, SERT, 5-HT_{1A} and Pet-1 in tissue cultures and *in situ* by immunostaining detected on a confocal microscope. **Results:** Serotonergic cells and terminals were observed in the midbrain on day 17 of gestation, and in neopallium cocultures on days 13 and 16. TPH, 5-HT, SERT and Pet-1 immunopositive cells were also observed in the neopallium on day 12 of culture. **Conclusions:** The presence of serotonergic cells and other elements of the serotonergic system in the early cerebral cortex was confirmed, which may be transient and participate in cortical maturation processes during brain development.

KEYWORDS: Cerebral cortex. Serotonergic neurons. Serotonin. Tryptophan-5-hydroxylase.

*Correspondencia:

Gabriel Manjarrez-Gutiérrez
E-mail: gmanjarrezg@gmail.com

Fecha de recepción: 10-04-2023

Fecha de aceptación: 21-08-2023

DOI: 10.24875/GMM.23000143

Gac Med Mex. 2023;159:390-397

Disponible en PubMed

www.gacetamedicademexico.com

0016-3813/© 2023 Academia Nacional de Medicina de México, A.C. Publicado por Permanyer. Este es un artículo *open access* bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Antecedentes

Tanto 5-hidroxitriptamina (5-HT) como sus receptores específicos unidos a canales iónicos o a cascadas metabotrópicas tienen diversas funciones en los primeros períodos del desarrollo cerebral.¹⁻³ En el Laboratorio de Neurontogenia el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) se obtuvo información complementaria sobre el papel funcional de 5-HT en estructuras neuroblásticas, como los conos de crecimiento axonal del encéfalo de rata en el día 17 de gestación,⁴ la presencia de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{1B},⁵ y la vía sintética de 5-HT, así como la presencia de un sistema liberador de 5-HT dependiente de K⁺ y Ca⁺⁺, y un sistema de captación dependiente de Na⁺.^{4,6} Durante el desarrollo cerebral también se ha descrito un aumento transitorio de la expresión del transportador de serotonina (SERT) y 5-HT en las terminales nerviosas de las áreas sensoriales de la corteza cerebral.^{7,8} La aparición temprana de terminales serotoninérgicas en la corteza cerebral en maduración es particularmente intensa, especialmente en las áreas sensoriales, incluidas la visual, somatosensorial y auditiva.^{7,9,10} Mazer¹¹ informó que una disminución de las señales serotoninérgicas influye en el desarrollo normal y la maduración de la corteza cerebral al reducirse la densidad sináptica, con el consiguiente daño del desarrollo cognitivo. Asimismo, 5-HT desempeña un papel regulador en diversas áreas corticales a través de las terminales axónicas de las neuronas serotoninérgicas ubicadas en los núcleos del rafe mesencefálico; hasta donde sabemos, esto último no se observó en la corteza cerebral en desarrollo de ratas. En el pez cebra se han observado células 5-HT en el área pretectal del prosencéfalo basal^{12,13} y se ha reportado la expresión transitoria de SERT y VMAT₂.¹⁴ Lebrand¹⁴ propuso que la regulación de la corticogénesis por 5-HT en ratas se produce mediante fibras tálamo-corticales apoyadas por receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{1B}, así como SERT.^{15,16}

Existen otros tipos de neuronas de aparición temprana en la corteza cerebral en crecimiento, como las neuronas de Cajal-Retzius en la zona marginal, relacionadas con la migración celular y el patrón de desarrollo celular de adentro hacia afuera de la corteza;^{17,18} así como las neuronas inmunopositivas GABAérgicas y la tirosina hidroxilasa en la corteza dorsolateral y medial que se identifican antes y después del nacimiento de la rata.^{19,20} Es probable que su expresión fenotípica esté

regulada epigenéticamente, como en el sistema nervioso periférico.^{21,22} Por lo tanto, las neuronas corticales pueden expresar transitoriamente algunas moléculas enzimáticas como tirosina hidroxilasa²⁰ y otros neurotransmisores.²³ La aparición temprana (días 10 y 11 de gestación) de neuronas GABAérgicas y noradrenérgicas también se observa durante los períodos pre y posnatal. Su expresión en el cerebro en maduración puede ser transitoria y desempeñar un papel importante en la diferenciación de las células corticales.²⁰

Conforme a los resultados mencionados, el presente trabajo se llevó a cabo con la intención de obtener más información sobre la presencia de células serotoninérgicas y la expresión de triptófano-5-hidroxilasa, SERT, 5-HT, el receptor 5-HT_{1A} y Pet-1 en la corteza cerebral en desarrollo.

Material y métodos

Estudio observacional descriptivo en ratas Wistar hembras nulíparas con un peso de 200 ± 10 g. Las ratas se adaptaron durante dos semanas bajo las siguientes condiciones: 22 ± 2 °C de temperatura, luces encendidas de 7:00 a 19:00 horas, así como mínimo ruido y manipulación. Durante este período, los animales fueron alimentados con pélets (Purina) y agua *ad libitum*. Después de dos semanas, las ratas se aparearon con machos normales. La presencia de tapón se consideró como el día de gestación 1 y la edad gestacional se determinó con la distancia del cráneo a la rabadilla de los fetos. En los días de gestación 13, 16 y 17 se realizó una cesárea bajo anestesia (40 mg/kg de pentobarbital intraperitoneal). Los encéfalos se diseccionaron en dos regiones, es decir, el mesencéfalo y el neopallio, para determinar la presencia de células serotoninérgicas y la expresión de TPH, SERT, 5-HT, 5-HT_{1A} y Pet-1 *in situ* y en cultivos organotípicos, mediante inmunofluorescencia con anticuerpos para cada molécula; la observación se llevó a cabo con microscopio confocal (Leica TCS SP2™, Leica Microsystems).

El Comité Interno de Ética del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), Instituto Politécnico Nacional, aprobó el protocolo experimental para el uso de animales de experimentación, de acuerdo con la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Cultivos organotípicos

En general se siguió el método Stoppini.²⁴ Los encéfalos fueron colocados en agarosa de bajo punto de

fusión a 6 % en solución amortiguadora de fosfato salino (PBS). Se obtuvieron cortes de 300 μm con un vibratomo en la zona del mesencéfalo, siguiendo las coordenadas de Foster y Lavdas. Los días 13 y 16 se diseccionaron fragmentos del neopallio de entre 0.5 y 1.0 mm.²⁵⁻²⁷

Inmunomarcación y microscopia de fluorescencia

Los tejidos se lavaron en PBS con pH de 7.4, y se fijaron con paraformaldehído a 4 %. La inmunomarcación se realizó con anticuerpos policlonales para 5-HT_{1A}, 5-HT y SERT (1:1000) o con anticuerpos monoclonales para la identificación de TPH, GFAP y Pet-1. Se emplearon anticuerpos secundarios fluorescentes (1:500) para isotiocianato de fluoresceína (Jackson IR), fluoresceína (Pierce), Alexa Fluor 568™ (Molecular Probes) y lisamina-rodamina (LRSC, Jackson IR). Se realizó microscopia confocal (Leica, TCS SP2) para identificar y localizar las moléculas marcadas.

Resultados

La Figura 1A muestra células inmunopositivas a 5-HT y proyecciones axonales en el mesencéfalo en cocultivo con neopallio; solo se observaron células inmunopositivas a 5-HT en el neopallio en cocultivo con mesencéfalo a los 13 días de gestación (Figura 1B). Además, se identificaron células de neopallio no cultivadas positivas a TPH y células de neopallio en cocultivo positivas a 5-HT_{1A} (Figuras 1C y 1D).

En cuanto a las células de neopallio en cocultivo inmunopositivas a TPH y SERT, se observó la colocalización de ambas moléculas en las mismas células el día 13 de gestación (Figura 2A). Asimismo, 5-HT coexiste con SERT en las mismas células de neopallio en cocultivo con mesencéfalo (Figura 2B).

La Figura 3A muestra que TPH y 5-HT coexisten en la misma célula en neopallio en cocultivo, así como que células inmunopositivas a 5-HT también se colocalizan con células inmunopositivas a TPH en neopallio no cultivado en el día 13 de edad gestacional (Figura 3B).

En la Figura 4A, el anticuerpo GFAP, un marcador glial, fue positivo junto con el anticuerpo TPH, compartiendo la misma ubicación celular en tejido de corteza fetal cultivado e *in situ* (Figura 4B). Además, GFAP coexiste con 5-HT en la misma célula de neopallio estudiado *in situ* (Figura 4C).

Es importante destacar que, como se esperaba, en la Figura 5A se puede observar positividad a Pet-1 en

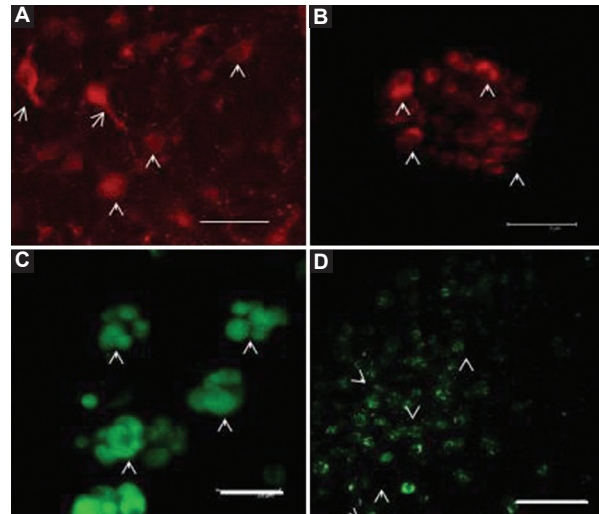


Figura 1. A: células inmunopositivas a 5-HT y proyecciones axonales en cocultivo de mesencéfalo con neopallio. Escala: 75 μm . B: células inmunopositivas a 5-HT en neopallio en cocultivo. Escala: 5 μm . C: células no cultivadas positivas a TPH en neopallio. Escala: 20 μm . D: células positivas a 5-HT_{1A} en neopallio en cocultivo. Escala: 75 μm . Las puntas de flecha indican células y las flechas, proyecciones.

células mesencefálicas cocultivadas e *in situ* en el rafe fetal en el día 17 de gestación, la cual coexistió con la positividad a otros marcadores de 5-HT. Lo mismo se observó en el neopallio el día 16 de gestación, tanto en cocultivo como *in situ* (Figura 5B).

En la Figura 6A se observan células 5-HT positivas con fibras ya ramificadas después de nueve días de cultivo; estas fibras no se observaron el día 11 de cultivo (Figura 6B).

Discusión

Como lo presentó nuestro grupo en un artículo anterior, inesperadamente se observaron células inmunopositivas a 5-HT en la corteza cerebral en maduración de ratas, tanto en cocultivo con tejido mesencefálico como en tejido de neopallio no cultivado, así como en tejido de neopallio analizado *in situ*.²⁷ Estas células podrían tener un fenotipo serotoninérgico transitorio y su presencia en la corteza cerebral primitiva podría apoyar los procesos corticogénicos, porque exhiben toda la maquinaria biosintética de 5-HT.²⁷ 5-HT es uno de los neurotransmisores más abundantes y cruciales en el cerebro de mamíferos y humanos y es fundamental en el desarrollo cerebral prenatal y posnatal.¹

En una etapa inicial, estas células serotoninérgicas revelaron un rasgo diferenciador de tipo neuronal,

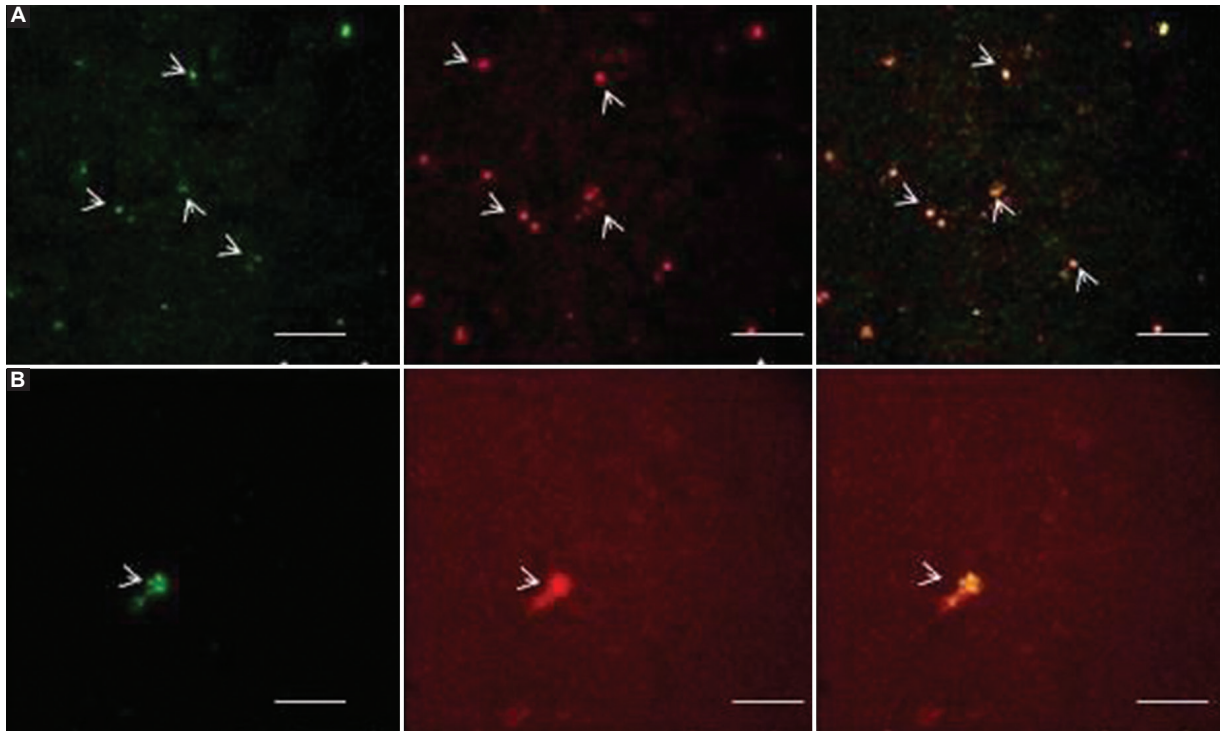


Figura 2. A: TPH (verde) y SERT (rojo) coexisten en células de neopalio en cocultivo (amarillas). **B:** 5-HT (verde) también coexiste con SERT (rojo) en las mismas células (amarillo) de neopalio en cocultivo con mesencéfalo. Escala: 75 μ m. Las puntas de flecha indican células.

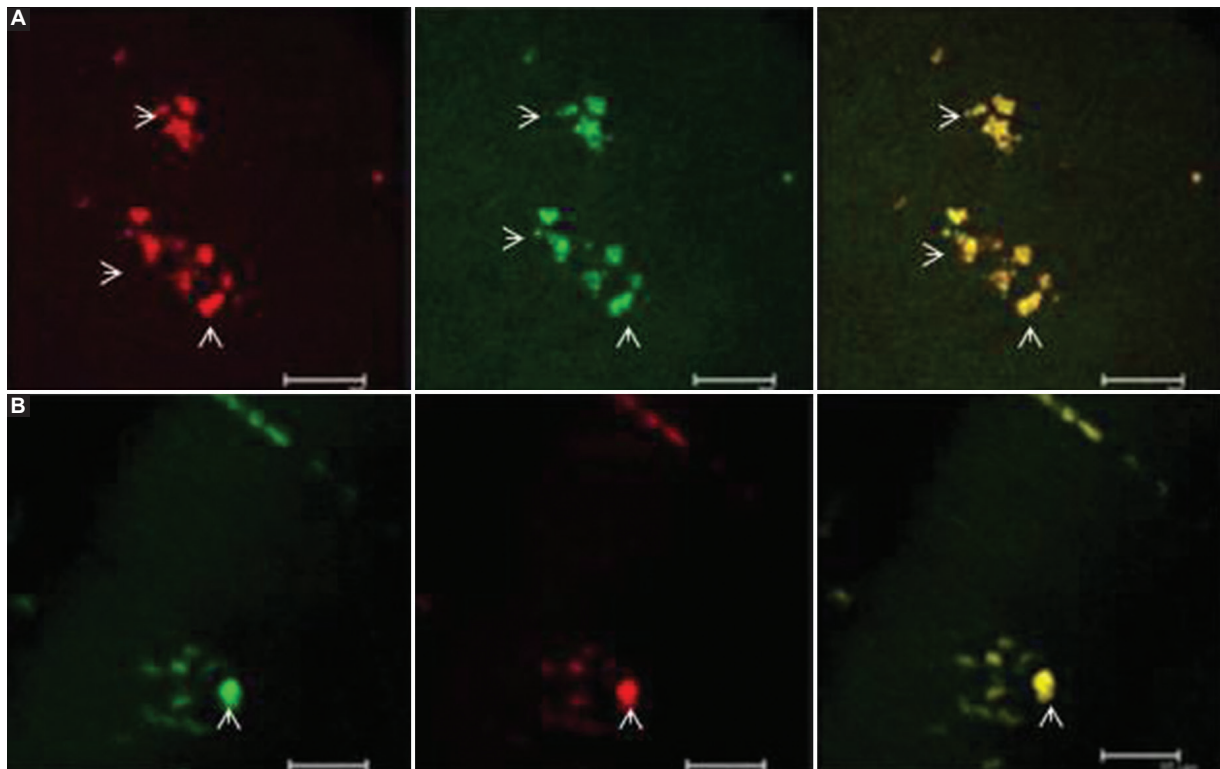


Figura 3. A: 5-HT (rojo) coexiste con TPH (verde) en la misma célula (amarilla) de neopalio en cocultivo con mesencéfalo. Escala: 75 μ m. **B:** coexistencia de TPH (verde) y 5-HT (rojo) en la misma célula (amarillo) de neopalio no cultivado. Escala: 35 μ m. Las puntas de flecha indican células.

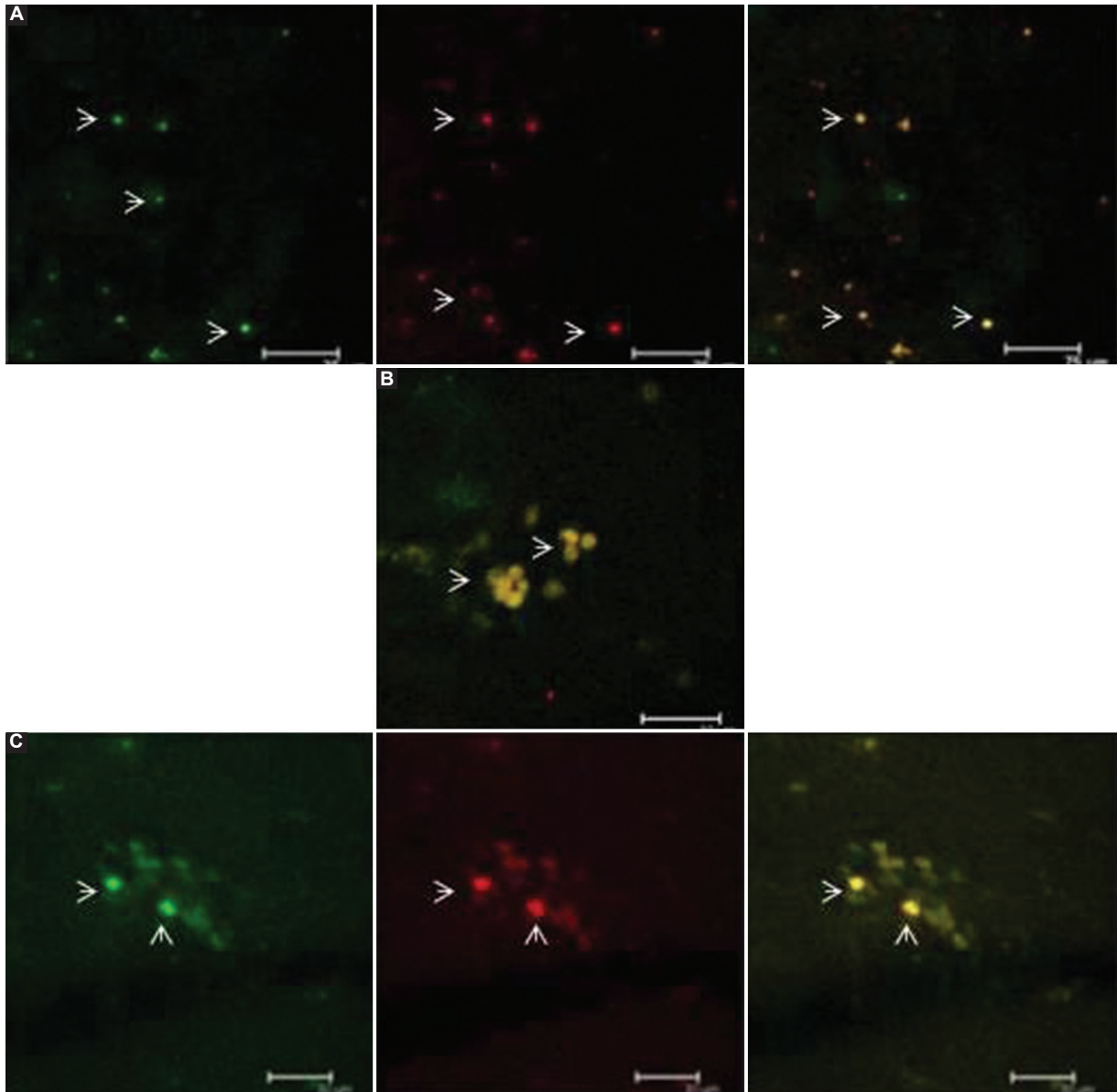


Figura 4. A: las células positivas a GFAP (verde) también exhiben TPH (rojo) y la coexistencia de ambos marcadores (amarillo) en neopalio en cocultivo con mesencéfalo. Escala: 75 μ m. B: se puede observar GFAP y TPH coexistiendo (amarillo) en las células de neopalio no cultivadas. Escala: 30 μ m. C: las células gliales, con el marcador positivo para GFAP (verde) también exhiben 5-HT (rojo) en neopalio no cultivado. Escala: 30 μ m. Las puntas de flecha indican células.

como la formación temprana de fibras nerviosas (Figura 6A). Sin embargo, posteriormente estos rasgos ya no se observaron (Figura 6B), lo que sugiere su posible participación en un proceso de desdiferenciación. También se han encontrado presencias tempranas de células serotoninérgicas *in situ* en los días 16 y 17 de gestación. Curiosamente, algunas de estas células también expresaron el fenotipo glial GFAP (Figura 4), lo que sugiere un papel de las células gliales en esta etapa. Otras células también expresaron

el dominio específico de transformación de eritroblastos; el factor de transcripción Pet-1 es un componente del complejo genético que genera el fenotipo 5-HT.²⁸ La red molecular de este fenotipo está compuesta no solo por Pet-1, sino también por NAX2.2, Lmx1b, factor B y GATA3, que constituyen la vía molecular para la especificación del fenotipo de las células que expresan 5-HT.^{28,29} Pet-1 es, según Hendricks *et al.*²⁸ un marcador temprano y preciso de las neuronas centrales que sintetizan 5-HT. Los sitios de unión de

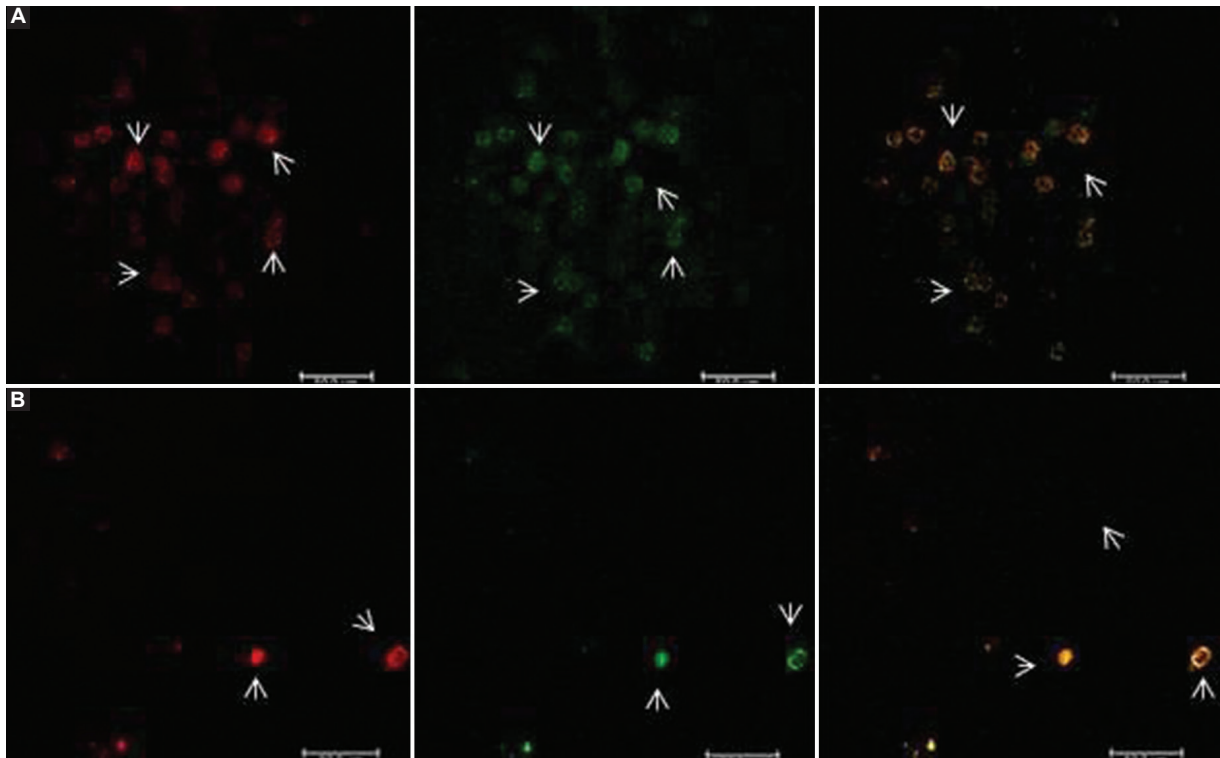


Figura 5. A: las células inmunopositivas a Pet-1 (rojas) también son positivas a 5-HT (verde), en mesencéfalo en cocultivo con neopalio. Ambas marcas coexisten en las mismas células (amarillo). B: se pueden observar Pet-1 (rojo) y 5-HT (verde) coexistiendo en células cocultivadas de neopalio (amarillo). Escala: 50 μ m. Las puntas de flecha indican células.

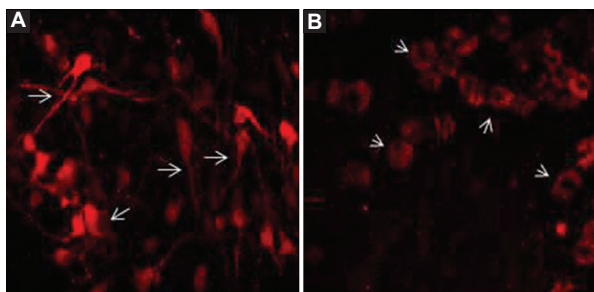


Figura 6. Neopalio en cocultivo con mesencéfalo. A: las células positivas a 5-HT se muestran con fibras ya ramificadas (nueve días de cocultivo). B: en una etapa posterior no se observaron estas fibras (11 días de cocultivo). Escala: 50 μ m. Las puntas de flecha indican células.

Pet-1 están ubicados en áreas clave de los genes que expresan las principales moléculas específicas de 5-HT, donde Pet-1 ejerce su función reguladora. Estos datos respaldan el uso de Pet-1 como un marcador más viable para las neuronas que expresan el fenotipo 5-HT (Figura 5).²⁸

Se sabe que también aparecen otros tipos de células monoaminérgicas durante un período temprano de maduración cerebral en embriones de rata. Antes del

día 10 de vida fetal se pueden identificar células dopaminérgicas y GABAérgicas, que probablemente también estén implicadas en la neurogénesis.^{19,20,30} Las neuronas serotoninérgicas también aparecen en los primeros períodos de la gestación neural (días de gestación 11 y 12) y forman los núcleos del rafe mesencefálico.¹⁵ Sin embargo, como se informó y confirmó anteriormente,²⁷ las células 5-HT también aparecen en la corteza cerebral en desarrollo de las ratas en periodo fetal. La interrupción prenatal de 5-HT puede provocar una alteración del desarrollo del cerebro fetal y un mayor riesgo de trastornos psiquiátricos durante la infancia y la edad adulta. La alteración de la señalización 5-HT se ha asociado a diversos trastornos neurológicos como depresión, ansiedad, psicosis, espectro autista, restricción del crecimiento fetal y trastorno por déficit de atención e hiperactividad.³¹⁻³⁵

Con los datos actuales podemos concluir que las células que llevan el fenotipo serotoninérgico están presentes en la corteza cerebral inmadura y que demuestran características neuronales o gliales. Sugerimos que estas células podrían apoyar la diferenciación cortical y que su presencia es transitoria. Alternativamente pueden pertenecer a las llamadas

“células cuasi serotoninérgicas”, cuya función y características aún no están definidas.²⁷

Agradecimientos

Los autores agradecen al doctor Víctor Alemán por su valioso apoyo y a Marisol Bautista Flores por su asistencia técnica, adscritos al Laboratorio de Neurontogenia, Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias; así como a Rafael Leyva Muñoz, de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio, del CINVESTAV-Instituto Politécnico Nacional.

Financiamiento

Este estudio se realizó gracias al apoyo financiero otorgado por el CINVESTAV-Instituto Politécnico Nacional.

Conflicto de interés

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses con respecto a este artículo.

Consideraciones éticas

Protección de sujetos humanos y animales. Los autores declaran que los procedimientos seguidos estuvieron de acuerdo con las normas del comité de ética de investigación clínica correspondiente y con las del Código de Ética de la Asociación Médica Mundial (Declaración de Helsinki).

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Uso de inteligencia artificial para la generación de texto. Los autores declaran que no han utilizado ningún tipo de inteligencia artificial generativa para la redacción de este manuscrito, ni para la creación de imágenes, gráficos, tablas o sus correspondientes pies de foto.

Bibliografía

- Whitaker-Azmitia PM. Serotonin and development. En: Müller CP, Cunningham KA, editores. Handbook of behavioral neuroscience. Elsevier; 2020. pp. 413-435.
- Teleanu RI, Niculescu AG, Roza E, Vladăncenco O, Grumezescu AM, Teleanu DM. Neurotransmitters-key factors in neurological and neurodegenerative disorders of the central nervous system. Int J Mol Sci. 2022;23(11):5954. DOI: 10.3390/ijms23115954
- Gaspar P, Cases O, Maroteaux L. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. Nat Rev Neurosci. 2003;4(12):1002-12.
- Mercado R, Hernández J. A molecular recognizing system of serotonin in rat fetal axonal growth cones: uptake and high affinity binding. Brain Res Dev Brain Res. 1992;69(1):133-7.
- Bonnin A, Levitt P. Placental source for 5-HT that tunes fetal brain development. Neuropsychopharmacology. 2012;37(1):299-300. DOI: 10.1038/npp.2011.194
- Mercado R, Florán B, Hernández J. Regulated release of serotonin from axonal growth cones isolated from the fetal rat brain. Neurochem Int. 1998;32(1):103-6.
- D'Amato RJ, Blue ME, Largent BL, Lynch DR, Ledbetter DJ, Molliver ME, Snyder SH. Ontogeny of the serotonergic projection to rat neocortex: transient expression of a dense innervation to primary sensory areas. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987;84(12):4322-6.
- Murphy DL, Lerner A, Rudnick G, Lesch KP. Serotonin transporter: gene, genetic disorders, and pharmacogenetics. Mol Interv. 2004;4(2):109-23. DOI: 10.1124/mi.4.2.8
- Bennett-Clarke CA, Chiaia NL, Crissman RS, Rhoades RW. The source of the transient serotonergic input to the developing visual and somatosensory cortices in rat. Neuroscience. 1991;43(1):163-83.
- Kostović I, Judas M. Transient patterns of cortical lamination during prenatal life: do they have implications for treatment? Neurosci Biobehav Rev. 2007;31(8):1157-68. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2007.04.018
- Mazer C, Muneayirci J, Taheny K, Raio N, Borella A, Whitaker-Azmitia P. Serotonin depletion during synaptogenesis leads to decreased synaptic density and learning deficits in the adult rat: a possible model of neurodevelopmental disorders with cognitive deficits. Brain Res. 1997;760(1-2):68-73.
- Cheng RK, Jesuthasan SJ, Penney TB. Zebrafish forebrain and temporal conditioning. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2014;369(1637):20120462.
- Cunha V, Rodrigues P, Santos MM, Moradas-Ferreira P, Ferreira M. Fluoxetine modulates the transcription of genes involved in serotonin, dopamine and adrenergic signalling in zebrafish embryos. Chemosphere. 2018;191:954-61. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.10.100
- Lebrand C, Cases O, Wehrli R, Blakely RD, Edwards RH, Gaspar P. Transient developmental expression of monoamine transporters in the rodent forebrain. J Comp Neurol. 1998;401(4):506-24.
- Verney C, Lebrand C, Gaspar P. Changing distribution of monoaminergic markers in the developing human cerebral cortex with special emphasis on the serotonin transporter. Anat Rec. 2002;267(2):87-93. DOI:10.1002/ar.10089
- Manjarrez G, Manuel-A L, Mercado-CR, Hernández-RJ. Serotonergic receptors in the brain of *in utero* undernourished rats. Int J Dev Neurosci. 2003;21(5):283-9.
- Tkachenko LA, Zykin PA, Nasyrov RA, Krasnoshchekova EI. Distinctive features of the human marginal zone and Cajal-Retzius cells: comparison of morphological and immunocytochemical features at midgestation. Front Neuroanat. 2016;10:26. DOI: 10.3389/fnana.2016.00026
- Pinson A, Huttner WB. Neocortex expansion in development and evolution from genes to progenitor cell biology. Curr Opin Cell Biol. 2021; 73:9-18. DOI: 10.1016/j.ceb.2021.04.008
- Asmus SE, Anderson EK, Ball MW, Barnes BA, Bohnen AM, Brown AM, et al. Neurochemical characterization of tyrosine hydroxylase-immunoreactive interneurons in the developing rat cerebral cortex. Brain Res. 2008;1222:95-105. DOI: 10.1016/j.brainres.2008.05.053
- Carter DA. Molecular phenotyping of transient postnatal tyrosine hydroxylase neurons in the rat bed nucleus of the stria terminalis. J Chem Neuroanat. 2017;82:29-38. DOI: 10.1016/j.jchemneu.2017.04.002
- Barlow AJ, Wallace AS, Thapar N, Burns AJ. Critical numbers of neural crest cells are required in the pathways from the neural tube to the foregut to ensure complete enteric nervous system formation. Development. 2008;135(9):1681-91. DOI: 10.1242/dev.017418
- Mehta AS, Ha P, Zhu K, Li S, Ting K, Soo C, et al. Physiological electric fields induce directional migration of mammalian cranial neural crest cells. Dev Biol. 2021;471:97-105. DOI: 10.1016/j.ydbio.2020.12.011.
- Ojeda J, Ávila A. Early actions of neurotransmitters during cortex development and maturation of reprogrammed neurons. Front Synaptic Neurosci. 2019;11:33.
- Stoppini L, Buchs PA, Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. J Neurosci Methods. 1991;37(2):173-82.
- Foster GA. Chemical neuroanatomy of the prenatal rat brain. A developmental atlas. Oxford, Reino Unido: Oxford University Press; 1998; 231 pp.
- Humpel C. Organotypic brain slice cultures. Curr Protoc Immunol. 2018;123(1):e59. DOI: 10.1002/cpim.59.
- Boyo A, Gutiérrez G, Rodríguez J. Molecular signaling of 5-HT_{1A} and presence of serotonergic cells in the fetal cerebral cortex. World J Neurosci. 2013;3:76-82.
- Hendricks TJ, Fyodorov DV, Wegman LJ, Lelutiu NB, Pehek EA, Yamamoto B, et al. Pet-1 ETS gene plays a critical role in 5-HT neuron development and is required for normal anxiety-like and aggressive behavior. Neuron. 2003;37(2):233-47. DOI:10.1016/s0896-6273(02)01167-4
- Cheng L, Chen CL, Luo P, Tan M, Qiu M, Johnson R, Ma Q. Lmx1b, Pet-1, and Nkx2.2 coordinately specify serotonergic neurotransmitter phenotype. J Neurosci. 2003;23(31):9961-7.

30. Mi D, Li Z, Lim L, Li M, Moissidis M, Yang Y, et al. Early emergence of cortical interneuron diversity in the mouse embryo. *Science*. 2018;360(6384):81-5. DOI: 10.1126/science.aar6821
31. Xia G, Han Y, Meng F, He Y, Srisai D, Farias M, et al. Reciprocal control of obesity and anxiety-depressive disorder via a GABA and serotonin neural circuit. *Mol Psychiatry*. 2021;26(7):2837-53. DOI: 10.1038/s41380-021-01053-w
32. Yang CJ, Tan HP, Du YJ. The developmental disruptions of serotonin signaling may involved in autism during early brain development. *Neuroscience*. 2014;267:1-10. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2014.02.021
33. Brummelte S, Mc Glanaghy E, Bonnin A, Oberlander TF. Developmental changes in serotonin signaling: Implications for early brain function, behavior and adaptation. *Neuroscience*. 2017;342:212-31. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2016.02.037
34. Manjarrez G, Cisneros I, Herrera R, Vázquez F, Robles A, Hernández J. Prenatal impairment of brain serotonergic transmission in infants. *J Pediatr*. 2005;147(5):592-6.
35. Fernández-Cruz MC, Lara-Pérez G, Mondragón-Herrera JA, Hernández-Rodríguez J, Manjarrez-Gutiérrez G. Brain serotonergic tone in schoolchildren with ADHD through the N1/P2 component of the auditory evoked potentials. *J Psychiatry Ment Health*. 2019;4(2). DOI: 10.16966/2474-7769.131