



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Departamento de Farmacobiología

**“Efecto del antagonismo del receptor 5-HT<sub>6</sub> y de la inhibición del  
transportador de GABA (GAT1) sobre la formación de la memoria y la  
amnesia”**

**Tesis que presenta:**

Biól. Luis Alfredo Márquez García

**Para obtener el Grado de:**

Maestro en Ciencias en

Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

**Director de Tesis:**

Dr. Alfredo Meneses Hernández

Esta tesis fue realizada con el financiamiento otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca de maestría número 613377.

## **DEDICATORIA**

A mi madre, por el gran ejemplo de fortaleza, por su cariño, confianza, comprensión y motivación continua.

A mi padre, por su confianza, por su enseñanza de la perseverancia y de la dedicación.

A mis hermanitas, Kari, Yareli y Dayani por su cariño, motivación y admiración para conmigo.

A mi hermano Uriel por su confianza y motivación constante.

A mis amigos de la universidad, Tania Lizbeth, Nadia, Ali, Tania Álvarez, Kary, John e Isaín por su ánimo y por creer en mi potencial, su compañía y charlas siempre me vinieron muy bien.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al **Dr. Alfredo Meneses Hernández** por transmitirme su entusiasmo por la ciencia, confianza, apoyo y paciencia. Le admiro y aprecio.

A mis sinodales, **Dra. Ruth Ivonne Téllez Ballesteros** y **Dr. David Centurión Pacheco** por sus acertados comentarios al proyecto de investigación y escritura de tesis.

Al **Ing. José Rodolfo Fernández** por su excelente apoyo técnico con el equipo de evaluación de conducta.

A mi colega de laboratorio **Roberto González Pérez** por sus valiosas sugerencias en la realización de algunos experimentos y por las charlas amenas en el laboratorio.

A mi amiga Angélica por hacer más amena mi estancia en Cinvestav y por apoyarme cuando más lo necesité.

# CONTENIDO

GLOSARIO DE ABREVIATURAS	I
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABLAS	V
ABSTRACT	VI
RESUMEN	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Aprendizaje y Memoria	2
1.2 Formación de la memoria y estructuras cerebrales asociadas	4
1.2.1 Circuito trisináptico y subestructuras hipocampales	4
1.3 Bases moleculares de la memoria	5
1.3.1 Mecanismos moleculares de la plasticidad sináptica: LTP	7
1.4 Neuroanatomía del sistema serotoninérgico	9
1.5 Neuroanatomía del sistema colinérgico	10
1.6 Neuroanatomía del sistema glutamatérgico y GABAérgico	12
1.7 Amnesia y su modelación experimental	12
1.7.1 Déficit de memoria por hipofunción colinérgica	13
1.7.2 Déficit de memoria por hipofunción glutamatérgica	14
1.8 Participación del sistema serotoninérgico en la memoria: Generalidades	15
1.8.1 Receptores a 5-HT	16
1.8.2 Receptor 5-HT <sub>6</sub> : Estructura y distribución	16
1.8.3 Vías de señalización intracelular del receptor 5-HT <sub>6</sub>	18
1.8.4 Vía dependiente de Fyn	19
1.8.5 Inhibición de canales de K <sup>+</sup>	20
1.8.6 Vía dependiente de Jab1	20
1.8.7 Vía dependiente de Rho-A	21
1.8.8 Vía de mTOR	22
1.9 Participación del receptor 5-HT <sub>6</sub> en la memoria: un potencial blanco terapéutico	22
1.9.1 Posibles mecanismos neuroquímicos implicados en los efectos promnésicos y anti-amnésicos del receptor 5-HT <sub>6</sub>	23
1.10 Participación del sistema GABAérgico en la memoria: Generalidades	27
1.10.1 Receptores GABA <sub>A</sub>	28
1.10.2 Receptores GABA <sub>B</sub>	28
1.10.3 Transmisión GABAérgica	29

1.11 Participación de GABA en la memoria	30
1.11.1 El Transportador GAT1: Estructura, localización y función	31
1.11.2 Participación de GAT1 en la memoria	32
1.12 Paradigma de automoldeamiento	33
2. JUSTIFICACIÓN	34
3. HIPÓTESIS	34
4. OBJETIVO GENERAL	34
5. OBJETIVOS PARTICULARES	34
6. MATERIALES Y MÉTODOS	35
6.1 Animales	35
6.2 Restricción de alimento	35
6.3 Paradigma de automoldeamiento	35
6.3.1 Fase de entrenamiento	36
6.3.2 Fase de prueba: Evaluación de memoria de corto y largo plazo	36
6.4 Fármacos	36
6.5 Diseño experimental	37
6.6 Grupos experimentales	37
6.7 Análisis estadístico	38
7. RESULTADOS	39
7.1 Formación de la memoria en la prueba de automoldeamiento	39
7.2 Efecto del antagonismo del receptor 5-HT <sub>6</sub> en la formación de la memoria	39
7.3 Efecto de la inhibición de GAT1 en la formación de la memoria	40
7.4 Inducción de amnesia por hipofunción colinérgica e hipofunción glutamatérgica en la formación de la memoria	41
7.5 Efecto del antagonismo del receptor 5-HT <sub>6</sub> en un modelo de amnesia inducido por escopolamina	42
7.6 Efecto del antagonismo del receptor 5-HT <sub>6</sub> en un modelo de amnesia inducido por dizocilpina	42
7.7 Efecto de la inhibición de GAT1 en un modelo de amnesia inducido por escopolamina	43
7.8 Efecto de la inhibición de GAT1 en un modelo de amnesia inducido por dizocilpina	44
7.9 Efecto de la inhibición de GAT1 sobre la respuesta de SB-357134 en la formación de la memoria	45
7.10 Efecto de la inhibición de GAT1 sobre la respuesta de SB-357134 en un modelo de amnesia inducido por escopolamina	46

7.11 Efecto de la inhibición de GAT1 sobre la respuesta de SB-357134 en un modelo de amnesia inducido por dizocilpina	47
8. DISCUSIÓN	48
8.1 El antagonismo del receptor 5-HT <sub>6</sub> facilita la MCP durante la formación de la memoria	48
8.2 La inhibición de GAT1 afecta diferencialmente a la formación de la memoria	51
8.3 El antagonismo del receptor 5-HT <sub>6</sub> evita el efecto amnésico inducido por escopolamina o dizocilpina	52
8.4 La inhibición de GAT1 evita el efecto amnésico inducido por dizocilpina, pero no por escopolamina	54
8.5 La inhibición de GAT1 evita el efecto promnésico inducido por el antagonismo del receptor 5-HT <sub>6</sub> en la formación de la memoria	55
8.6 La inhibición de GAT1 interfiere con los efectos anti-amnésicos del bloqueo del receptor 5-HT <sub>6</sub> en la prueba de automoldeamiento	58
9. CONCLUSIONES PARTICULARES	60
10. CONCLUSIÓN GENERAL	60
11. PERSPECTIVAS	60
12. REFERENCIAS	61

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

<b>5-HT</b>	5-hidroxitriptamina o serotonina
<b>5-HT<sub>6</sub></b>	Receptor a serotonina subtipo 6
<b>AMPA</b>	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
<b>BDNF</b>	Factor neurotrófico derivado del cerebro
<b>CA1</b>	Región Cornus Amonis 1
<b>CA3</b>	Región Cornus Amonis 3
<b>CaMKII</b>	Cinasa tipo II dependiente de Ca <sup>2+</sup> -calmodulina
<b>ChAT</b>	Colina acetiltransferasa
<b>cAMP</b>	3',5'-adenosín monofosfato cíclico
<b>CREB</b>	Elemento de respuesta al cAMP
<b>DAT</b>	Transportador de dopamina
<b>EC</b>	Estímulo condicionado
<b>EI</b>	Estímulo incondicionado
<b>ERK1/2</b>	Cinasa reguladora de señales extracelulares 1/2
<b>EPSP</b>	Potencial postsináptico excitatorio
<b>GABA</b>	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>GABA-T</b>	GABA transaminasa
<b>GAD</b>	Descarboxilasa del ácido glutámico
<b>GAT1</b>	Transportador de GABA 1
<b>GD</b>	Giro dentado
<b>GIRK</b>	Canales rectificadores entrantes de K <sup>+</sup>
<b>i.p.</b>	intraperitoneal
<b>LTP</b>	Potenciación a largo plazo
<b>MAO-A</b>	Monoaminoxidasa A
<b>MAPK</b>	MAP cinasa
<b>MCP</b>	Memoria de corto plazo
<b>MLP</b>	Memoria de largo plazo
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>mTOR</b>	Blanco de la rapamicina en mamíferos
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>NPY</b>	Neuropéptido Y
<b>PCR</b>	Reacción de la cadena de la polimerasa

<b>PKA</b>	Proteína cinasa A
<b>PKC</b>	Proteína cinasa C
<b>p.o.</b>	Oral
<b>RC</b>	Respuesta condicionada
<b>s.c.</b>	Subcutánea
<b>SERT</b>	Transportador de serotonina
<b>siRNA</b>	Ácido ribonucleico pequeño de interferencia
<b>SSADH</b>	Succinato semialdehído deshidrogenasa
<b>t<sub>1/2</sub></b>	Vida media
<b>TPH</b>	Triptófano hidroxilasa
<b>vGluT</b>	Transportador de glutamato vesicular
<b>VMAT2</b>	Transportador de monoaminas vesicular 2
<b>VIP</b>	Péptido intestinal vasoactivo

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de la memoria.	3
Figura 2. Circuito trisináptico hipocampal de formación de memoria.	5
Figura 3. Fenómeno de sensibilización en el invertebrado marino <i>A. californica</i> .	6
Figura 4. Mecanismos moleculares que subyacen a la formación de la memoria.	8
Figura 5. Representación esquemática de las principales proyecciones de los núcleos serotoninérgicos del rafé en una sección sagital del cerebro de la rata.	9
Figura 6. Representación esquemática de las principales proyecciones de los núcleos colinérgicos en una sección sagital del cerebro de la rata.	10
Figura 7. Representación esquemática de los patrones de proyección de núcleos colinérgicos del prosencéfalo basal.	11
Figura 8. Vías de señalización intracelular asociadas al receptor 5-HT <sub>6</sub> .	19
Figura 9. Mecanismo neuroquímico propuesto mediante el cual el bloqueo del receptor 5-HT <sub>6</sub> evoca efectos promnésicos o anti-amnésicos.	26
Figura 10. Diseño experimental general de trabajo.	37
Figura 11. Grupos farmacológicos a evaluar en el protocolo de formación de la memoria en la prueba de automoldeamiento.	38
Figura 12. Formación de la memoria en la prueba de automoldeamiento.	39
Figura 13. Efecto de SB-357134 en la formación de la memoria en la prueba de automoldeamiento.	40
Figura 14. Efecto de NNC-711 en la formación de la memoria en la prueba de automoldeamiento.	40
Figura 15. Efecto de escopolamina y dizocilpina en la formación de la memoria en la prueba de automoldeamiento.	41
Figura 16. Efecto de SB-357134 en un modelo de amnesia inducido por escopolamina en la prueba de automoldeamiento.	42
Figura 17. Efecto de SB-357134 en un modelo de amnesia inducido por dizocilpina en la prueba de automoldeamiento.	43
Figura 18. Efecto de la inhibición de GAT1 en un modelo de amnesia inducido por escopolamina en la prueba de automoldeamiento.	44
Figura 19. Efecto de la inhibición de GAT1 en un modelo de amnesia inducido por dizocilpina en la prueba de automoldeamiento.	44
Figura 20. Efecto de la combinación de SB-357134 + NNC-711 en la formación de la memoria.	45
Figura 21. Efecto de la combinación SB-357134 + NNC-711 + escopolamina en la prueba de automoldeamiento.	46
Figura 22. Efecto de la combinación SB-357134 + NNC-711 + dizocilpina en la prueba de automoldeamiento.	47
Figura 23. Mecanismo propuesto de participación del receptor 5-HT <sub>6</sub> en condiciones sin aprendizaje y en formación de memoria.	50

Figura 24. Representación gráfica de los efectos anti-amnésicos evocados por el antagonismo del receptor 5-HT<sub>6</sub>

53

Figura 25. Representación gráfica del efecto de la inhibición de GAT1 sobre el efecto promnésico inducido por el antagonismo del receptor 5-HT<sub>6</sub>.

56

## **LISTA DE TABLAS**

Tabla 1. Localización del receptor 5-HT <sub>6</sub> por población neuronal.	18
Tabla 2. Efecto de antagonistas del receptor 5-HT <sub>6</sub> sobre la memoria en diversas pruebas conductuales.	24
Tabla 3. Efectos neuroquímicos de la modulación del receptor 5-HT <sub>6</sub> en regiones cortico-límbicas.	25

## **ABSTRACT**

Preclinic studies suggest that antagonism of the 5-HT<sub>6</sub> receptor is a promising approach for memory deficits; however, the underlying neurochemical mechanisms are poorly known under memory conditions. Here, we tested the hypothesis that a decrease in GABAergic activity might be crucial to evoke positive effects of 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonists on memory. To achieve this aim, using pharmacological and behavioral approaches, we investigated the effect of transporter GAT1 inhibition on the effects evoked by 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonism under conditions of memory formation (short-term memory and large-term memory) and amnesia (induced by scopolamine or dizocilpine) in an autoshaping paradigm. Firstly, we examined the effect of the 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist, SB-357134 (0.5, 1 and 3 mg/kg, p.o.), and GAT1 transporter inhibitor, NNC-711 (0.25, 0.5 and 1 mg/kg, i.p.) on memory formation. Subsequently, we evaluated the effect of SB-357134 (3 mg/kg) or NNC-711 (0.5 mg/kg) on amnesia induced by scopolamine (0.25 mg/kg, i.p.) or dizocilpine (0.1 mg/kg, i.p.). Our results showed that SB-357134 (3 mg/kg) improved short-term memory and avoided scopolamine-induced or dizocilpine-induced amnesic effects. Moreover, NNC-711 evoked differential effects on memory formation, at 0.5 mg/kg dose improved short-term memory, but at 0.5 and 1 mg/kg doses impaired long-term memory (48 h post-training). Finally, exploring if an increase in GABA levels modifies the promnesic and anti-amnesic effects of SB-357134, we evaluated the effect of coadministration of SB-357134 (3 mg/kg) + NNC-711 (0.5 mg/kg) as well as coadministration of SB-357134 (3 mg/kg) + NNC-711 (0.5 mg/kg) + scopolamine (0.25 mg/kg) or dizocilpine (0.1 mg/kg) in the autoshaping paradigm. The results showed that GAT1 inhibition by NNC-711(0.5 mg/kg) prevented both the promnesic and anti-amnesic effects evoked by SB-357134 (3 mg/kg).

Collectively, these data suggest that a decrease in GABAergic neurotransmission is implicated in mediate the promnesic and anti-amnesic effects of 5-HT<sub>6</sub> receptor blockage. To our knowledge, this work is the first to demonstrate a relationship between GABA levels (through GAT1 transporter inhibition) and the antagonism of 5-HT<sub>6</sub> receptor under condition of memory formation and amnesia.

## RESUMEN

Estudios preclínicos sugieren que el antagonismo del receptor 5-HT<sub>6</sub> es una estrategia terapéutica prometedora para los déficits de memoria, sin embargo, los mecanismos neuroquímicos subyacentes son escasamente conocidos en distintas condiciones de memoria. Aquí, probamos la hipótesis de que una disminución en la actividad GABAérgica puede ser esencial para evocar los efectos positivos de antagonistas del receptor 5-HT<sub>6</sub> sobre la memoria. Para ello, usando enfoques farmacológicos y conductuales, evaluamos el efecto de la inhibición del transportador GAT1 sobre los efectos evocados por el antagonismo del receptor 5-HT<sub>6</sub> en condiciones de formación de memoria (memoria de corto plazo y memoria de largo plazo) y amnesia (inducida por escopolamina o dizocilpina) en una prueba de automoldeamiento. En primera instancia, examinamos el efecto del antagonista del receptor 5-HT<sub>6</sub> SB-357134 (0.5, 1 y 3 mg/kg, p.o.) y del inhibidor del transportador GAT1 NNC-711 (0.25, 0.5 y 1 mg/kg, i.p.) en la formación de la memoria. De manera subsecuente, evaluamos el efecto de SB-357134 (3 mg/kg) o NNC-711 (0.5 mg/kg) en la amnesia inducida por escopolamina (0.25 mg/kg, i.p.) o dizocilpina (0.1 mg/kg). Nuestros resultados mostraron que SB-357134 (3 mg/kg) mejoró la memoria de corto plazo y evitó los efectos amnésicos inducidos por escopolamina o dizocilpina. Por otra parte, NNC-711 evocó efectos diferenciales en la formación de la memoria, a dosis de 0.5 mg/kg mejoró la memoria de corto plazo, pero a dosis de 0.5 y 1 mg/kg deterioró la memoria de largo plazo (48 h post-entrenamiento). Finalmente, explorando si un incremento en los niveles de GABA modifica el efecto promnésico y anti-amnésico de SB-357134, evaluamos el efecto de la coadministración de SB-357134 (3 mg/kg) + NNC-711 (0.5 mg/kg) así como de la coadministración de SB-357134 (3 mg/kg) + NNC-711 (0.5 mg/kg) + escopolamina (0.25 mg/kg) o dizocilpina (0.1 mg/kg) en la prueba de automoldeamiento. Los resultados mostraron que la inhibición de GAT1 por NNC-711 (0.5 mg/kg) previno tanto los efectos promnésicos y anti-amnésicos evocados por SB-357134 (3 mg/kg).

En conjunto, estos datos sugieren que una disminución en la neurotransmisión GABAérgica está implicada en mediar los efectos promnésicos y anti-amnésicos mediados por el bloqueo del receptor 5-HT<sub>6</sub>. A nuestro conocimiento, este es el primer trabajo en demostrar una relación entre los niveles de GABA (a través de la inhibición de GAT1) y el antagonismo del receptor 5-HT<sub>6</sub> bajo condiciones de formación de memoria y amnesia.

## 1. INTRODUCCIÓN

La pérdida de memoria es un componente importante de diversos trastornos neuropsiquiátricos incluyendo la enfermedad de Alzheimer (Meneses, 2017a), la esquizofrenia y la enfermedad de Parkinson (Millan *et al.*, 2012), para los cuales no existe un tratamiento efectivo. En el caso de la enfermedad de Alzheimer, los compuestos aprobados para el tratamiento de los déficits de memoria como inhibidores de la acetilcolinesterasa y memantina (antagonista del receptor NMDA) solo ofrecen beneficios moderados en estabilizar o mejorar los síntomas cognitivos y suelen disminuir su efectividad (Ferrero *et al.*, 2017), por lo tanto, es necesario nuevas opciones terapéuticas para el tratamiento del déficit de memoria.

En este contexto, diversos estudios preclínicos sugieren que el receptor 5-HT<sub>6</sub> representa un potencial blanco terapéutico para el tratamiento de los déficits de memoria (Codony *et al.*, 2011). Actualmente, la evidencia preclínica demuestra que el antagonismo del receptor 5-HT<sub>6</sub> evoca efectos promnésicos y anti-amnésicos en diversos paradigmas de memoria (Pérez-García y Meneses, 2005; Marcos *et al.*, 2008; Da Silva Costa-Aze *et al.*, 2012; Woods *et al.*, 2012; de Bruin *et al.*, 2016).

Por consiguiente, varios antagonistas del receptor 5-HT<sub>6</sub> han sido sometidos a evaluación en ensayos clínicos para tratar los déficits de memoria en la enfermedad de Alzheimer (Ferrero *et al.*, 2016). Desafortunadamente, los resultados de ensayos clínicos de fase III no han sido satisfactorios y probablemente se deban a que los mecanismos neuroquímicos implicados en mediar los efectos promnésicos y anti-amnésicos de antagonistas del receptor 5-HT<sub>6</sub> se han caracterizado poco en condiciones de memoria. En este contexto, se ha hipotetizado energicamente que los efectos anti-amnésicos y pro-cognitivos de antagonistas del receptor 5-HT<sub>6</sub> se deben al aumento de la actividad de neuronas colinérgicas y glutamatérgicas de hipocampo y corteza prefrontal a través de la disminución en la actividad de neuronas e interneuronas GABAérgicas (Codony *et al.*, 2011; Woods *et al.*, 2012; Helboe *et al.*, 2015). No obstante, no hay evidencia que lo demuestre bajo condiciones de memoria.

Entre los marcadores neuronales, los transportadores de monoaminas son clave para la memoria y la amnesia (Tellez *et al.*, 2012), incluyendo a GAT1 que es el transportador de GABA más abundante en neuronas, específicamente, en terminales GABAérgicas y cuya función principal es

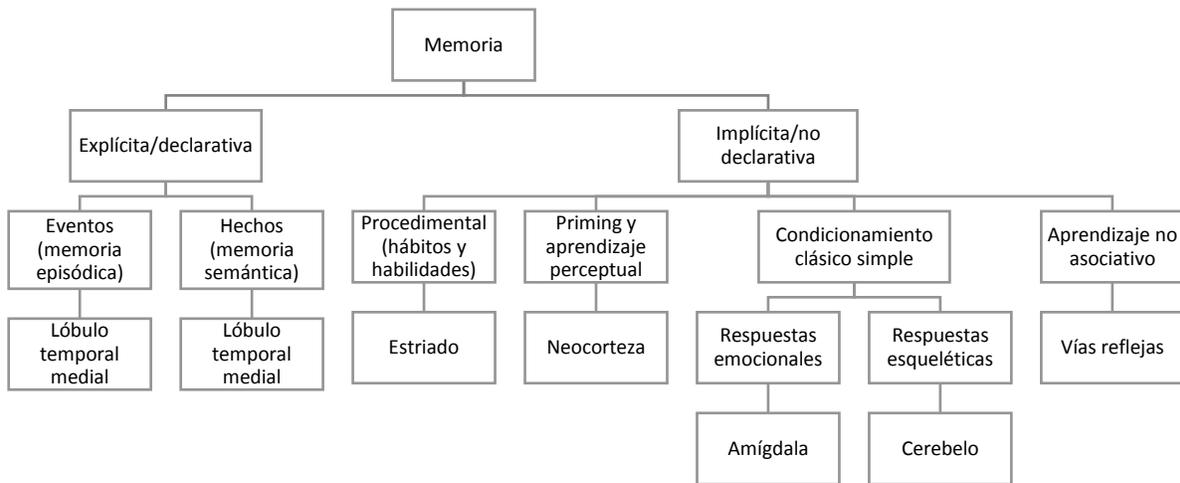
mediar la recaptura de GABA extracelular (Gonzalez-Burgos, 2010). Además, estudios genéticos en ratones muestran que la sobreexpresión (Hu *et al.*, 2004) o supresión (Gong *et al.*, 2009) de GAT1 deteriora diversos tipos de memoria, en contraste, ratones con genotipo heterocigoto GAT1  $^{+/-}$  (disminución de la expresión de GAT1) muestran una mejoría en la memoria espacial y asociativa (Shi *et al.*, 2012). Así mismo, estudios farmacológicos demuestran que inhibidores de GAT1 pueden evocar efectos diferenciales en la memoria: pro-memoria (O'Connell *et al.*, 2001), anti-amnésicos (O'Connell *et al.*, 2001; Salat *et al.*, 2015) y amnésicos (Schmitt y Hiemke, 2002). Aunque aún no es claro por qué inhibidores del transportador GAT1 afectan diferencialmente a la memoria (O'Connell *et al.*, 2001) es concluyente que una regulación fina de los niveles de GABA es crítica para los procesos de memoria. Por lo tanto, la inhibición farmacológica de GAT1 es una excelente estrategia experimental para estudiar los efectos de la neurotransmisión GABAérgica sobre la memoria.

En síntesis, en este trabajo se estudia el efecto de la interacción de un antagonista del receptor 5-HT<sub>6</sub> y de un inhibidor selectivo del transportador GAT1 en la formación de la memoria y la amnesia con la finalidad de dilucidar la participación de GABA en los efectos de antagonistas del receptor 5-HT<sub>6</sub> en condiciones fisiológicas como la formación de la memoria y en condiciones patológicas como la amnesia.

## **1.1 Aprendizaje y Memoria**

La memoria es una serie de mecanismos neuronales parcialmente separados que permiten la adquisición, consolidación, retención y recuperación de información obtenida de diversos dominios sensoriales (Millan *et al.*, 2012). En constaste, el aprendizaje se define como la adquisición de información o de una conducta a través de la experiencia o el entrenamiento (Meneses, 2017; Millan *et al.*, 2012).

De acuerdo con su contenido, la memoria se clasifica en declarativa o explícita y no declarativa o implícita. La memoria declarativa da cuenta de la capacidad de recolección consciente de hechos (memoria semántica) y eventos (memoria episódica); en contraste, la memoria no declarativa se refiere a la colección de habilidades inconscientes que incluyen el aprendizaje de hábitos y habilidades, el priming (ej. inferencia de una palabra a partir de presentación del morfema), formas de condicionamiento clásico y vías reflejas (véase Figura 1) (Zola-Morgan y Squire, 1993).



**Figura 1. Clasificación de la memoria.** Clasificación de la memoria de acuerdo con su contenido. Modificada de Squire (2004).

En términos neuroanatómicos, la memoria declarativa está asociada a estructuras como el hipocampo (incluyendo giro dentado y complejo subicular) y áreas corticales adyacentes anatómicamente relacionadas al hipocampo, especialmente, las cortezas entorrhinal, perirrhinal y parahipocampal (Zola-Morgan y Squire, 1993). Por otra parte, la memoria implícita está mediada por diversas estructuras incluyendo: el cuerpo estriado, el cual es la principal vía de entrada a los ganglios basales (Burke *et al.*, 2017) y, además implicado en memorias de hábitos; la amígdala que se relaciona con las memorias con contenido emocional; y el cerebelo que está implicado en mediar ciertas memorias asociativas por ejemplo el condicionamiento del parpadeo.

Con respecto al tiempo, la memoria se clasifica como memoria de corto plazo (MCP) y memoria de largo plazo (MLP). La MCP comprende información retenida desde segundos hasta horas, mientras que, la MLP comprende periodos de días, años e incluso de por vida. Cabe destacar que la formación de la MLP requiere de un mecanismo denominado consolidación el cual es un proceso lábil dependiente del tiempo mediante el cual una memoria frágil como la MCP se convierte en un tipo de memoria más estables como la MLP (Millan *et al.*, 2012).

## **1.2 Formación de la memoria y estructuras cerebrales asociadas**

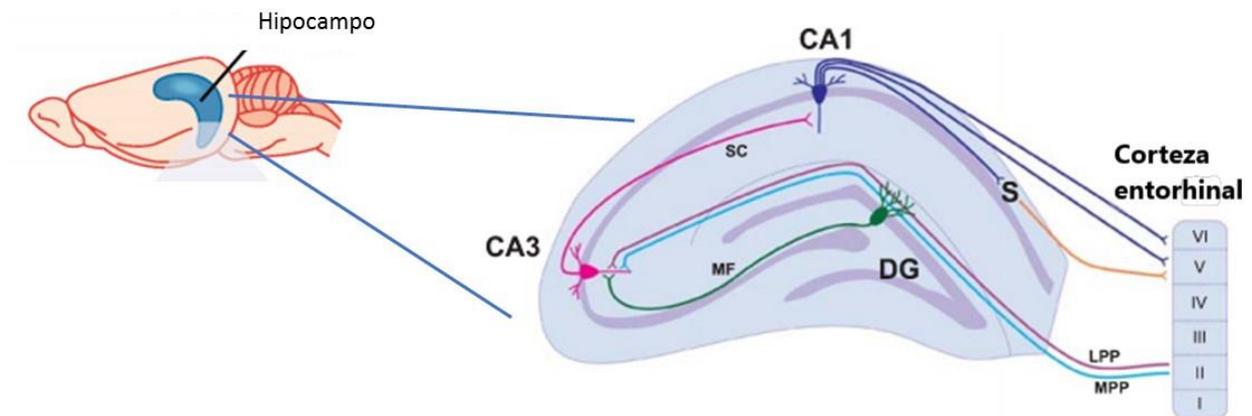
Parafraseando a Millan *et al.*, la formación de memoria es una serie de eventos mediante el cual se adquiere nueva información procedente de diversos dominios sensoriales, se codifica, y se almacena (Millan *et al.*, 2012). A continuación, se presenta el modelo clásico y más estudiado por el cual se forma la memoria explícita donde participan de manera importante el hipocampo y la neocorteza.

### **1.2.1 Circuito trisináptico y subestructuras hipocampales**

El hipocampo es un componente del sistema límbico que participa en la adquisición y consolidación de la memoria, se compone de cuatro subregiones: giro dentado (GD), cornus Amonis (CA1-3), presubiculum y subiculum (revisado en Yau *et al.*, 2015). Dentro del hipocampo existen circuitos neuronales que participan en el procesamiento de la información proveniente de diversos dominios sensoriales y tales circuitos son modulados por diversos sistemas de neurotransmisión incluyendo el glutamatergico, el GABAérgico, el colinérgico, el dopaminérgico, el noradrenérgico y el serotoninérgico (Myhrer, 2003). En primera instancia, la información (en forma de señales eléctricas y neuroquímicas) procedente de diversas áreas corticales (corteza somatosensorial, auditiva, visual entre otras) se dirige a una estructura del lóbulo temporal medial denominada corteza entorhinal. Una vez que la información llega a la corteza entorhinal, el flujo de información hacia el hipocampo es a través de un circuito trisináptico conformado por: la vía perforante, la vía de las fibras musgosas y la colateral de Schaffer.

La vía perforante es la principal fuente de entrada de información hacia el hipocampo, se conforma de axones de neuronas piramidales que se originan de las capas II y III de la corteza entorhinal y forman sinapsis glutamatérgicas sobre dendritas de células granulares del GD. Posteriormente, la información es transferida hacia la región CA3 del hipocampo a través del tracto de las fibras musgosas, esta vía está formada por axones de células granulares del GD que hacen sinapsis con neuronas piramidales de la región CA3. Sucesivamente, la información fluye hacia la región CA1 del hipocampo a través de la colateral de Schaffer que se conforma de axones de neuronas piramidales de la región CA3 que se proyectan y hacen sinapsis con neuronas piramidales de CA1. Finalmente, la información una vez consolidada, se puede transferir tanto al subiculum como de vuelta a la corteza entorhinal (véase Figura 2). De nuevo en la corteza entorhinal, la información consolidada se transfiere a áreas neocorticales para su almacenamiento

(revisado en Yau *et al.*, 2015). En resumen, el hipocampo media la consolidación de la información y diversas áreas neocorticales son el sitio de almacenamiento de las memorias de largo plazo.



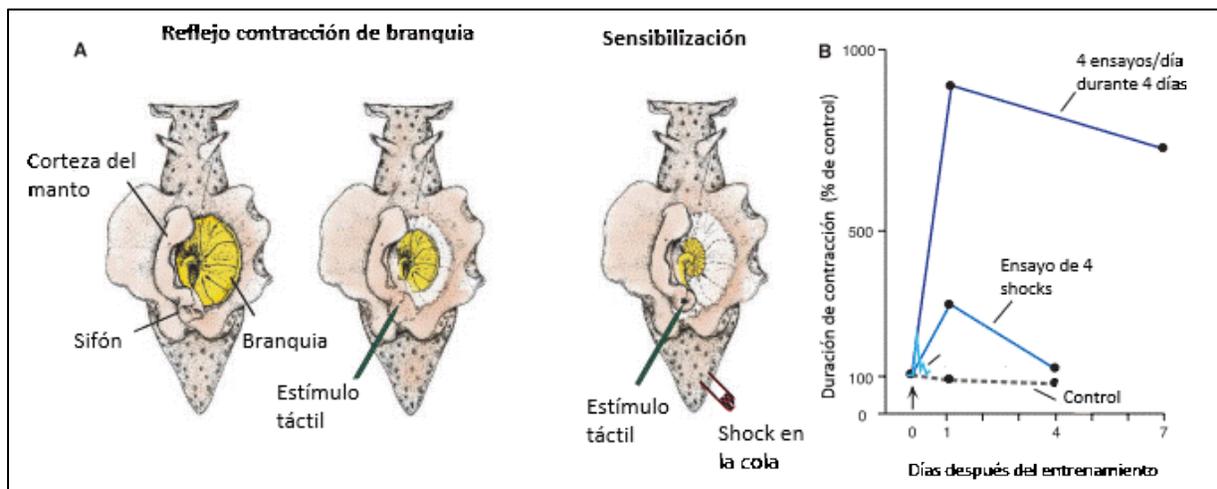
**Figura 2. Circuito trisináptico hipocampal de formación de memoria.** Desde una perspectiva reduccionista, el flujo de información entra al hipocampo a través de la vía perforante medial y lateral que se originan de la capa II/III de la corteza entorhinal. Una vez que la información alcanza células granulares del giro dentado, a través de sus fibras musgosas, la información se dirige a la región CA3 del hipocampo y posteriormente a través de la colateral de Schaffer, la información alcanza la región CA1 del hipocampo. En última instancia la información regresa a la corteza entorhinal a través de proyecciones axónicas directas o indirectas a través del subiculum. Una vez que la información ha sido consolidada en el hipocampo, se dirige a estructuras corticales para su almacenamiento a largo plazo. DG=giro dentado; S=subiculum; LPP= vía perforante lateral; MPP= vía perforante medial; MF= fibras musgosas; SC= colateral de Schaffer. Modificada de Patten *et al.*, (2015).

### 1.3 Bases moleculares de la memoria

El artículo seminal de Kandel “*The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses*” detalla elegantemente las bases moleculares de la memoria dado que por primera vez fue posible explicar fenómenos de aprendizaje y memoria en términos moleculares (Kandel, 2001). La elegancia del trabajo de Kandel radica en el enfoque reduccionista que utilizó para estudiar fenómenos altamente complejos como la memoria mediante el invertebrado marino *Aplysia californica* como animal modelo. Específicamente, Kandel estudió una forma de aprendizaje no asociativo denominado sensibilización caracterizado como un tipo de memoria implícita. Este fenómeno es resultado de aplicar durante la fase de entrenamiento un estímulo nocivo (ej. shock) en la cola del invertebrado y posteriormente estimular el sifón de manera táctil, en consecuencia, el animal responde contrayendo la branquia. Después del entrenamiento, la estimulación táctil del

sifón en ausencia del estímulo nocivo da como resultado la contracción de la branquia evidenciando un fenómeno de aprendizaje (véase Figura 3A).

Además, Kandel observó que dependiendo de la frecuencia e intensidad del estímulo nocivo se podían diferenciar eventos de sensibilización a corto plazo y sensibilización a largo plazo (véase Figura 3B). En particular, los eventos de corto plazo se asociaron a modificaciones covalentes de proteínas pre-existentes (fosforilación de proteínas), mientras que, los eventos de largo plazo se asociaron a transcripción génica, síntesis local de proteínas, formación de nuevas sinapsis y crecimiento de espinas dendríticas (Kandel, 2001). El trabajo de Kandel permitió identificar moléculas sumamente relevantes para la formación de la memoria como PKA, MAP cinasas, CREB-1 y CREB-2. Sin embargo, aunque los mecanismos celulares y moleculares del fenómeno de sensibilización fueron descritos inicialmente en un invertebrado marino, la evidencia demuestra que estos mecanismos se conservan en mamíferos y operan de manera similar tanto en memorias implícitas como en memorias explícitas (Barco *et al.*, 2006).



**Figura 3. Fenómeno de sensibilización en el invertebrado marino *A. californica*.** En A se representa la anatomía de *A. californica* que muestra un sifón, la branquia y la corteza del manto. Durante la fase de entrenamiento se estimula de manera táctil el sifón de *A. californica* que de manera inmediata responde contrayendo la branquia (reflejo contracción de la branquia). Posteriormente, cuando se aplica un shock eléctrico en la cola de *A. californica* y posteriormente se estimula el sifón, la respuesta de contracción de la branquia aumenta sustancialmente y a esta respuesta se le conoce como sensibilización. En B se observa que un protocolo de 4 shocks aumenta la duración de la contracción de la branquia y tal respuesta no se mantiene a través del tiempo (sensibilización a corto plazo). En contraste, un protocolo de 4 ensayos/día durante 4 días da como resultado un mayor tiempo de contracción de la branquia y esta respuesta se mantiene a través del tiempo (sensibilización a largo plazo). Tomada de Sweatt (2010).

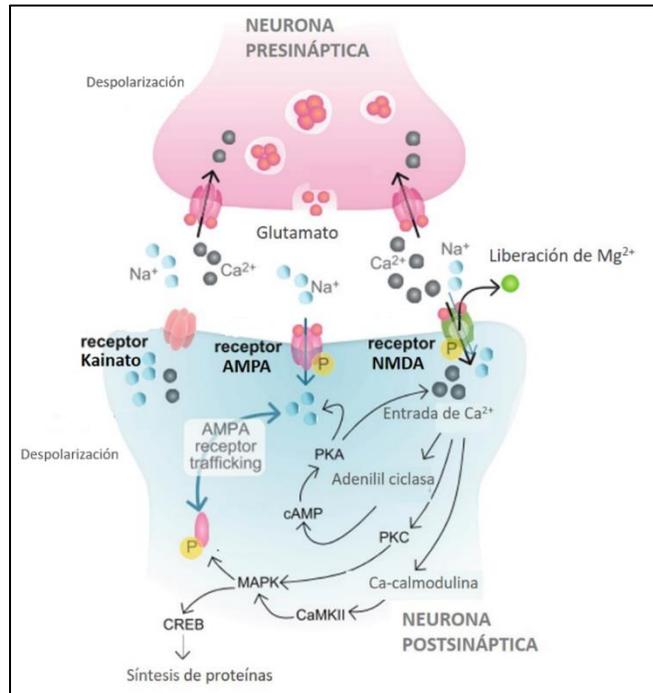
Acorde a lo anterior, en 1973 Bliss y Lømo reportaron el fenómeno fisiológico de potenciación a largo plazo (por sus siglas en inglés LTP) en conejo anestesiado. Estos investigadores observaron que la estimulación repetida a alta frecuencia (100 Hz) de fibras de la vía perforante del hipocampo aumentaba la amplitud de los potenciales postsinápticos excitatorios (EPSP) observados en neuronas piramidales del GD y que dicha respuesta se mantenía por periodos de horas (Bliss y Lømo 1973). Este hallazgo fue tan importante porque años atrás Hebb había propuesto que las memorias eran almacenadas como alteraciones en la fuerza de las conexiones sinápticas entre neuronas del sistema nervioso central, un proceso que actualmente se conoce como plasticidad sináptica y precisamente la LTP es una forma de plasticidad sináptica (Sweatt, 2010).

Dado los requerimientos temporales y estructurales compartidos entre los procesos de formación de memoria y la LTP, la LTP figura como el correlato más cercano a las bases moleculares de la memoria. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la LTP *per se* no explica todas las etapas que la memoria implica y no siempre se asocia positivamente a la memoria. Expuesto lo anterior, actualmente se sabe que tanto la LTP como la formación de la memoria requieren de dos fases temporales: LTP temprana y LTP tardía o memoria de corto plazo y memoria de largo plazo, respectivamente (Kandel, 2001; Sweatt, 2010). Durante las fases de corto plazo no se requiere de síntesis de proteínas, pero sí de modificaciones covalentes de proteínas pre-existentes y de cambios plásticos en conexiones sinápticas pre-existentes. En contraste, en las fases de largo plazo se requieren de síntesis de nuevas proteínas y de crecimiento o remodelación de conexiones sinápticas (Kandel *et al.*, 2014). A continuación, se describe brevemente las bases moleculares de la LTP como el correlato más cercano a la formación de la memoria.

### **1.3.1 Mecanismos moleculares de la plasticidad sináptica: LTP**

La LTP ha sido ampliamente descrita en la región CA1 del hipocampo. La inducción de la LTP inicia por la sincronización temporal de la despolarización de la neurona piramidal postsináptica y la liberación presináptica de glutamato, el glutamato difunde por la hendidura sináptica hasta activar a los receptores postsinápticos NMDA. La activación de estos receptores permite la entrada de  $Ca^{2+}$  que activa a diversas proteínas cinasas como CaMKII, PKC, PKA y MAPK que son necesarias para inducción y estabilización de la LTP. Es importante tener en cuenta que distintos neuromoduladores como dopamina, noradrenalina, acetilcolina y serotonina pueden regular la actividad de las proteínas antes mencionadas dado que la formación hipocampal recibe

entradas de este tipo de neuronas (Sweatt, 2010). La LTP temprana implica la inserción de receptores AMPA a la membrana para maximizar los efectos del glutamato, es decir, aumentar la fuerza sináptica (véase Figura 4).



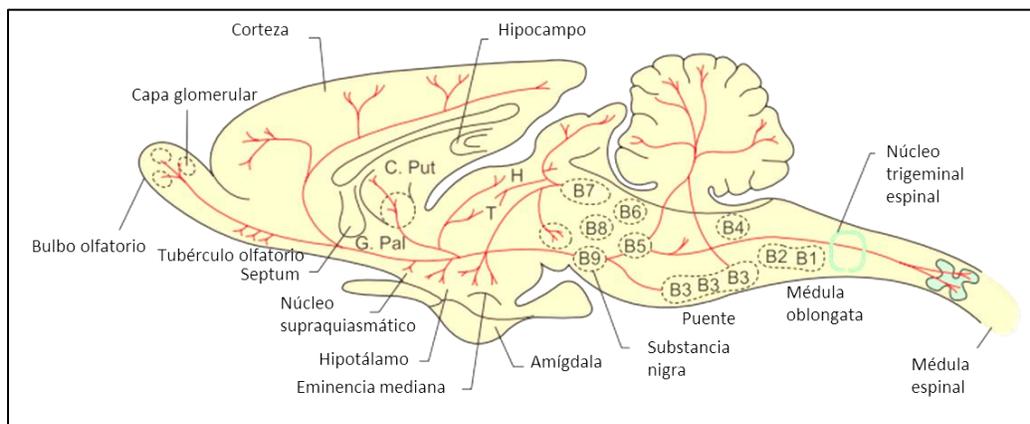
**Figura 4. Mecanismos moleculares que subyacen a la formación de la memoria.** La despolarización sincrónica de la neurona presináptica y de la neurona postsináptica permite la remoción de  $Mg^{2+}$  y la consecuente activación de receptores NMDA que permiten la entrada de  $Ca^{2+}$  a la célula. El incremento en el  $Ca^{2+}$  intracelular activa a proteínas como PKA a través de la enzima adenilil ciclasa, a la PKC y a la CaMKII que son responsables de fosforilar a receptores AMPA para aumentar las conductancias iónicas, es decir, aumentar la eficiencia sináptica. Sin embargo, si hay una estimulación persistente de las proteínas PKC, PKA o CaMKII el efecto resultante es la activación de la vía de las MAPK que fosforila al factor de transcripción CREB. La activación de CREB induce la transcripción génica y, por lo tanto, la síntesis de proteínas (no mostradas en figura) como BDNF, receptores NMDA y proteínas implicadas en la remodelación del citoesqueleto. Modificada de Korte y Schmitz (2016).

Por el contrario, la LTP tardía requiere de la expresión génica que es dependiente de proteínas cinasas incluyendo PKA y MAPK que en última instancia activan al factor de transcripción CREB-1 e inicia la transcripción génica cuyo resultado final son cambios estructurales en la sinapsis asociados a un alargamiento de espinas dendríticas y posiblemente a la adición de nuevas espinas

(revisado en Kandel *et al.* 2014). Moléculas como el BDNF y *c-fos* son marcadores neuronales de formación de la memoria y de la LTP. A continuación, se describe la neuroanatomía de los sistemas de neurotransmisión relevantes para la memoria y en particular para el presente estudio, estos son: el sistema serotoninérgico, el colinérgico, el glutamatérgico y el GABAérgico.

#### 1.4 Neuroanatomía del sistema serotoninérgico

Las neuronas serotoninérgicas tienen su origen en los núcleos del rafé que se localizan en la línea media del tallo cerebral, específicamente en el mesencéfalo. De acuerdo con Dahlstrom y Fuxe, las neuronas serotoninérgicas se agrupan en 9 grupos o núcleos denominados B1-9. En particular, las neuronas del núcleo del rafé dorsal (B6 y B7), núcleo del rafé mediano rostral (B8) y núcleo pontis oralis (B9) se proyectan de manera ascendente intervando a diversas estructuras corticales y subcorticales (véase Figura 5).



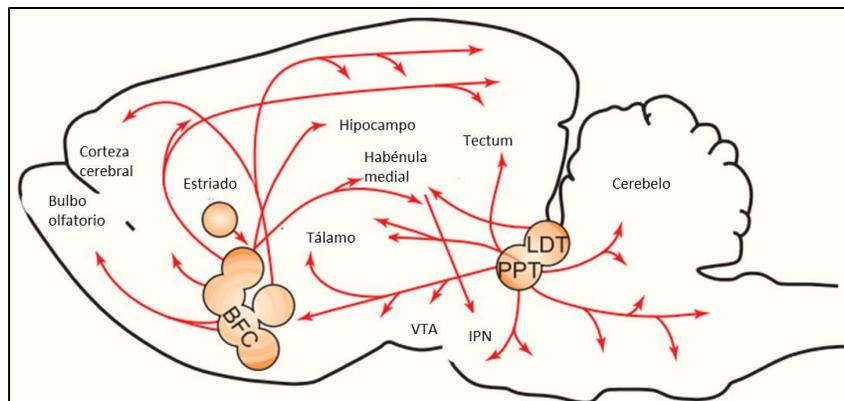
**Figura 5. Representación esquemática de las principales proyecciones de los núcleos serotoninérgicos del rafé en una sección sagital del cerebro de la rata.** Los núcleos B5-B9 se proyectan ascendente a estructuras corticales y subcorticales como hipocampo, amígdala, hipotálamo, caudado-putamen entre otras, mientras que, de manera descendente los núcleos B1-B4 se proyectan hacia la médula espinal. C. Put.= caudado-putamen. T= tálamo. H= habénula. G. Pal.= globo pálido. Para una descripción detallada véase texto. Tomada de Brady *et al.*, (2012).

Topográficamente, el núcleo del rafé mediano se proyecta fuertemente a regiones allocorticales y neocorticales (dentro de la capa I y II), hipocampo dorsal, septum lateral y núcleos hipotalámicos (supraquiasmáticos, paraventricular y periventricular), mientras que, el rafé dorsal inerva principalmente a regiones corticolímbicas y asociativas (dentro capa III y IV), hipocampo ventral, amígdala, globo pálido, estriado dorsal y varios núcleos hipotalámicos (arcuato, dorsomedial, supraquiasmático y periventricular) (King *et al.*, 2009; Brady *et al.*, 2012). Por otra parte, el núcleo

del rafé mediano caudal (B5) se proyecta hacia la médula oblongata y los núcleos palidus, obscurus, magnus y obscurus dorsolateral (B1-4) se proyectan descendentemente hacia la media espinal (Brady *et al.*, 2012). En general, las neuronas serotonérgicas se proyectan a estructuras que son relevantes para la memoria como el hipocampo, el estriado y diversas áreas corticales.

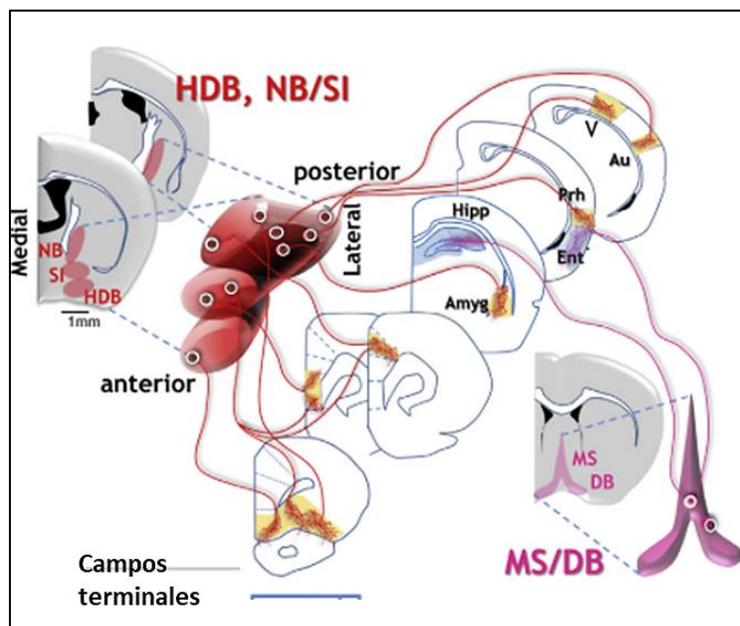
### 1.5 Neuroanatomía del sistema colinérgico

A diferencia del sistema serotonérgico, las neuronas del sistema colinérgico de mamíferos se originan de cuatro regiones: 1) núcleo tegmental dorsolateral y núcleo pedúnculo-pontino; 2) un subconjunto de núcleos talámicos; 3) estriado, cuyas neuronas colinérgicas son interneuronas locales; y 4) los núcleos del prosencéfalo basal (véase Figura 6). En conjunto, estas áreas envían proyecciones colinérgicas a neocorteza, hipocampo y amígdala (Ballinger *et al.*, 2016).



**Figura 6. Representación esquemática de las principales proyecciones de los núcleos colinérgicos en una sección sagital del cerebro de la rata.** La principal fuente de entrada colinérgica a la corteza cerebral e hipocampo es proporcionada por el complejo del prosencéfalo basal (BFC). Los cuerpos celulares de los núcleos basales de Meynert se proyectan a la neocorteza mientras que los cuerpos celulares en el núcleo horizontal de la banda diagonal de Broca y el área preóptica proyectan al bulbo olfatorio, amígdala y corteza límbica. Las áreas tegmental laterodorsal y pedunculopontina (LDT y PPT, respectivamente) de manera preferencial inervan al tallo cerebral y blancos en el mesencéfalo. En el estriado predominan interneuronas. VTA= área tegmental ventral. IPN= núcleo interpeduncular. Tomada de Brady *et al.* 2012.

Las neuronas que se originan en los núcleos del prosencéfalo basal son sumamente relevantes para el procesamiento cognitivo incluyendo la memoria dado que envían proyecciones hacia neocorteza, arqueocorteza y varias estructuras subcorticales (Ballinger *et al.*, 2016); en contraste, las neuronas colinérgicas del tallo cerebral son fundamentales para regular sueño, insomnio y control autonómico (Sarter y Bruno 2000). En particular, las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal se conforman por: el núcleo septal medial, los núcleos de la banda diagonal de Broca con sus dominios vertical y horizontal, el núcleo preóptico, el núcleo basal de Meynert y la sustancia innominata (véase Figura 7). Tanto el núcleo septal medial como los núcleos de la banda diagonal de Broca envían proyecciones axónicas al hipocampo, corteza entorhinal, bulbo olfatorio y estructuras corticales de la línea media. En contraste, el núcleo Basal de Meynert y la sustancia innominata son la principal fuente de inervación colinérgica de la neocorteza y la amígdala (Ballinger *et al.*, 2016).



**Figura 7. Representación esquemática de los patrones de proyección de núcleos colinérgicos del prosencéfalo basal.** De lado izquierdo se representan secciones coronales que indican la distribución aproximada anterior a posterior y medial a lateral de la rama horizontal de la banda diagonal de Broca (HDB) y del núcleo basal/ sustancia innominata (NB/SI). Las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal antero-medial se proyectan a sitios más posteriores tales como la amígdala basolateral y la corteza perirhinal. Del lado derecho, se representan neuronas del núcleo septal-medial (MS) y de la rama vertical de la banda diagonal de Broca (VDB) que proporcionan la entrada colinérgica al hipocampo y la corteza entorhinal. Hipp= hipocampo. Amyg= amígdala. Ent= corteza entorhinal. Prh= corteza perirhinal. Tomada de Ballinger *et al.* 2016.

## **1.6 Neuroanatomía del sistema glutamatérgico y GABAérgico**

Básicamente, tanto las neuronas glutamatérgicas como las neuronas GABAérgicas muestran una distribución ubicua en el cerebro. El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio en el sistema nervioso central y es el principal mediador de información sensorial, coordinación motora, emociones y cognición, incluyendo la formación y la recuperación de la memoria. Cabe mencionar que, alrededor del 80% de las sinapsis en el cerebro son glutamatérgicas. En tanto que el GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio en el cerebro adulto y regula el balance general excitación/inhibición (Brady *et al.*, 2012). Dada la amplia distribución de las neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas, solo se resalta que ambos tipos de neuronas están presentes en estriado, áreas corticales, hipocampo y amígdala.

## **1.7 Amnesia y su modelación experimental**

En términos generales, la amnesia es un proceso anormal de pérdida de información. Cronológicamente, la amnesia se clasifica como anterógrada y retrógrada; se considera anterógrada cuando eventos recientes no son transferidos a la memoria de largo plazo, es decir, hay una incapacidad de formar nuevas memorias; mientras que, la amnesia retrógrada se caracteriza por una memoria pobre respecto a eventos que ocurrieron solo antes de la amnesia, en otras palabras, existe una dificultad para evocar memorias pasadas (Meneses, 2017a).

Normalmente, la disminución en la capacidad de evocar o formar nuevas memorias disminuye durante el envejecimiento sin alcanzar un estado patológico, sin embargo, existen diversas causas que contribuyen al establecimiento de la amnesia como un estado con bases neuropatológicas. Entre las causas que contribuyen a los déficits de memoria se encuentran la hipertensión, los traumatismos craneoencefálicos, consumo crónico de alcohol que eventualmente evoluciona en el síndrome de Korsakoff, la isquemia cerebral, el estrés crónico, episodios de naturaleza traumática, entre otros (Millan *et al.*, 2012; Fagerholm *et al.*, 2015; Carnevale *et al.*, 2016; Arts *et al.*, 2017). Sin embargo, también es importante mencionar que, diversos trastornos neuropsiquiátricos con etiología y sintomatología diferente comparten el componente amnésico tales como la enfermedad de Alzheimer, la esquizofrenia, la enfermedad de Parkinson, trastorno del espectro autista, trastorno bipolar y trastorno de hiperactividad y déficit de atención (Millan *et al.*, 2012). Desafortunadamente, en varios de los trastornos neuropsiquiátricos la amnesia suele acentuarse de manera progresiva hasta el grado de convertirse en demencias (técnicamente definidas como

pérdida de memoria dramática que interfiere con la capacidad de realizar actividades diarias), por ejemplo, demencia tipo Alzheimer, demencia vascular y demencia frontotemporal (Meneses, 2017b).

Experimentalmente, la amnesia se puede modelar en animales mediante herramientas farmacológicas como la escopolamina y la dizocilpina.

### **1.7.1 Déficit de memoria por hipofunción colinérgica**

La escopolamina es un antagonista no selectivo de los receptores muscarínicos M1-M5 y se asocia a un déficit colinérgico semejante al observado en la enfermedad de Alzheimer (Bajo *et al.*, 2015), este antagonista muscarínico tiene una  $t_{1/2} = 4.5 \pm 1.7$  h, una afinidad ( $pK_i$ ) de 9-9.5 y después de 30 min por vía i.p., se detecta en cerebro (Huang *et al.*, 2001; Renner *et al.*, 2005). Todos los receptores muscarínicos están acoplados transduccionalmente a proteínas G: M1, M3 y M5 están acoplados a  $G_{\alpha q}$  la cual activa la vía de la fosfolipasa C (PLC), mientras que, M2 y M4 están acoplados a proteínas  $G_{\alpha i/o}$  y consecuentemente disminuyen la actividad de la enzima adenilato ciclasa y activan diversos canales iónicos como canales de  $K^+$ . A nivel central, escopolamina en altas dosis ( $>0.03$  mg/kg) genera ansiedad y déficits en el aprendizaje y memoria, en actividad locomotora y en la atención. A nivel periférico, escopolamina se asocia a dilatación de pupilas, disminución de salivación y contracción del musculo liso (revisado en Klinkenberg y Blokland, 2010). En general, se cree que los efectos centrales de escopolamina, en particular en la memoria, están mediados por los receptores M1 y posiblemente M5 (Blokland *et al.*, 2016). Tradicionalmente, escopolamina es el amnésico de referencia para modelar déficits de memoria en humanos y en animales. Diversos estudios sugieren que este compuesto simula importantemente los déficits de memoria observados en la vejez y en la enfermedad de Alzheimer (Ebert y Kirch, 1998), esto debido a que este compuesto bloquea diversos receptores muscarínicos localizados en hipocampo y en corteza entorhinal, y consecuentemente se interfiere con los procesos de codificación y recuperación de la información adquirida. En este contexto, se ha propuesto que altos niveles de acetilcolina facilitan la adquisición de información, mientras que, bajos niveles de acetilcolina permiten la recuperación de memorias almacenadas (revisado en Klinkenberg y Blokland, 2010). En resumen, los efectos de escopolamina sobre la memoria se deben principalmente a una interferencia en la codificación de nuevas memorias (Hasselmo, 2006),

lo cual hace que este compuesto sea una herramienta farmacológica confiable para modelar déficits de memoria.

### **1.7.2 Déficit de memoria por hipofunción glutamatérgica**

A finales de la década de los 50's se reportó que el anestésico disociativo fenciclidina era capaz de simular efectos similares a la esquizofrenia en sujetos sanos, años después se demostró que este efecto se debía principalmente al bloqueo de los receptores NMDA (revisado en Olney *et al.*, 1999). Este hallazgo sugirió que además de la hiperactividad dopaminérgica (ampliamente documentada), una hipofunción glutamatérgica mediada por receptor NMDA podría explicar la fisiopatología de la esquizofrenia. En seres humanos, los antagonistas de este receptor como la ketamina inducen disfunción cognitiva transitoria, aberraciones perceptuales y cambios reminiscentes de los síntomas negativos de la esquizofrenia. En roedores la hipofunción del receptor NMDA se asocia a conductas desorganizadas, movimientos estereotipados y déficits cognitivos (Gunduz-Bruce, 2009).

De manera interesante, aunque la hipótesis hipoglutamatérgica de la esquizofrenia señala una disminución de la actividad glutamatérgica global, se ha reportado un incremento de su actividad en áreas corticales, probablemente en receptores no-NMDA (receptores AMPA y de kainato) y estudios de microdiálisis muestran un incremento de glutamato en la corteza prefrontal (Moghaddam *et al.*, 1997). El mecanismo de acción propuesto sugiere que, antagonistas del receptor NMDA actúan principalmente sobre sus receptores localizados en neuronas GABAérgicas que en condiciones basales inhiben a neuronas piramidales de la corteza, por lo tanto, el resultado es un incremento de la liberación de glutamato (Gunduz-Bruce, 2009) que posiblemente explica las alteraciones cognitivas.

La dizocilpina o MK-801 es un antagonista no competitivo del receptor NMDA y al igual que otros antagonistas de este receptor simula déficits cognitivos similares a los observados en pacientes con esquizofrenia (Kovacic y Somanathan 2010). Este compuesto tiene una  $t_{1/2} \approx 2$  h y a partir de 10 min después de administrarse por vía i.p., se detecta en cerebro (Vezzani *et al.*, 1989). Diversos estudios han asociado el efecto de dizocilpina a deterioro de memoria de corto plazo, memoria episódica y memoria espacial (Meneses 2011; Kovacic y Somathan, 2010). Particularmente, la dizocilpina se une a la región de poro cerca del filtro de selectividad iónico del

receptor NMDA en su conformación abierta y de este modo bloquea al canal iónico (revisado en Morris *et al.*, 2005). Recientemente se demostró, mediante estudios de cristalografía en combinación con simulación de dinámica molecular de gran escala temporal, que dizocilpina reside dentro del poro del canal y se mantiene unido al átomo de N de la asparagina 612 (N612) de la subunidad GluN2B (Song *et al.*, 2018). Por lo tanto, la dizocilpina es una herramienta farmacológica confiable para evaluar compuestos que pueden ser de relevancia para el tratamiento de déficits de memoria observados en pacientes con esquizofrenia.

### **1.8 Participación del sistema serotoninérgico en la memoria: Generalidades**

La 5-hidroxitriptamina o serotonina (5-HT) es un neurotransmisor que se produce principalmente en neuronas serotoninérgicas localizadas en los núcleos del raqué dorsal que envían múltiples proyecciones a casi todo el cerebro incluyendo áreas corticales y áreas del sistema límbico como hipocampo y amígdala. El primer paso en la síntesis de 5-HT es la conversión del triptófano a 5-hidroxitriptófano (5-HTP) a través de triptófano hidroxilasa (TPH), la cual es la enzima limitante en la síntesis de 5-HT. A la fecha se conocen dos isoformas de la enzima TPH, TPH1 encontrada en varios tejidos y TPH2 que es la isoforma específica del cerebro (Walther *et al.*, 2003). Posteriormente, la enzima 5-HTP descarboxilasa convierte el 5-HTP a 5-HT. En el cerebro, 5-HT es almacenado desde el citoplasma hacia vesículas sinápticas a través del transportador de monoaminas vesicular (VMAT2). La 5-HT se libera en la sinapsis por exocitosis, un mecanismo dependiente de  $Ca^{2+}$ ; su recaptura desde la sinapsis es inducida por el transportador de la serotonina (SERT) o bien, puede degradarse a su principal metabolito el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) a través de la monoamino-oxidasa-A citoplásmica (MAO-A).

La 5-HT participa en la regulación de diversas funciones como estado de ánimo, sueño, ritmo circadiano, función motora, conductas reproductivas, termorregulación, funciones endocrinas y de manera importante en los procesos de aprendizaje y memoria. También, 5-HT está implicada en estados patológicos tales como ansiedad, depresión, adicciones, autismo, obesidad, enfermedad de Alzheimer y esquizofrenia (Filip y Bader, 2009).

Respecto a los procesos cognitivos, las neuronas serotoninérgicas desempeñan una función importante en MCP y MLP a través de sus inervaciones a la corteza frontal y diversas estructuras dentro del lóbulo temporal medial incluyendo, amígdala, hipocampo y corteza entorhinal

(Meneses y Liy-Salmeron, 2012). De acuerdo con la información anterior, en un estudio reciente mediante el uso de ratones *knock-out* con depleción constitutiva de 5-HT (ratones Pet1KO) se demostró, que la disminución de serotonina de manera selectiva afecta la memoria declarativa y la plasticidad sináptica hipocampal (Fernandez *et al.*, 2017); estos datos proporcionan una evidencia sustancial de la función de la serotonina en la memoria.

### **1.8.1 Receptores a 5-HT**

La 5-HT ejerce sus efectos a través de siete subtipos de receptores denominados 5-HT<sub>1-7</sub>. Con excepción del receptor 5-HT<sub>3</sub> el cual es un canal iónico dependiente de ligando, todos los demás receptores están acoplados transduccionalmente a proteínas G (Hannon y Hoyer, 2008). En este trabajo nos enfocamos en el estudio del receptor 5-HT<sub>6</sub>.

### **1.8.2 Receptor 5-HT<sub>6</sub>: Estructura y distribución**

El receptor 5-HT<sub>6</sub> fue descubierto a principios de los 90's como uno de los siete tipos de receptores en mediar los efectos de la serotonina. Este receptor pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G y estimula positivamente la actividad de la enzima adenilato-ciclasa. Estructuralmente el receptor 5-HT<sub>6</sub> se conforma por 438 aminoácidos en la rata y 440 aminoácidos en humanos y ratones; la forma humana de este receptor tiene un 89% de homología con su equivalente en la rata (Kohen *et al.*, 1996). Recientemente, se ha demostrado que el receptor 5-HT<sub>6</sub> muestra actividad constitutiva, es decir, muestra señalización a través de la enzima adenilato-ciclasa en ausencia del ligando endógeno, esta actividad se encuentra regulada por su interacción física con la neurofibromina (una proteína activadora de GTPasa), consecuentemente antagonistas o agonistas inversos pueden disminuir la vía de señalización de la adenilato-ciclasa (Deraredj Nadim *et al.*, 2016).

Estudios de hibridación *in situ* y autorradiografía muestran una expresión abundante del receptor 5-HT<sub>6</sub> en estriado, núcleo accumbens, ganglios basales y tubérculo olfatorio; y una expresión moderada en hipocampo dorsal y corteza cerebral (Hirst *et al.*, 2003; Helboe *et al.*, 2015). Este patrón de expresión en áreas asociadas a la memoria en conjunto con su distribución casi exclusiva en el cerebro (Hirst *et al.*, 2003), sugiere que el receptor 5-HT<sub>6</sub> puede ser un potencial blanco terapéutico para el tratamiento de diversos trastornos cognitivos y neuropsiquiátricos con pérdida de memoria como la enfermedad de Alzheimer, la esquizofrenia y la enfermedad de Parkinson.

Además, la evidencia preclínica también sugiere que el receptor 5-HT<sub>6</sub> es un blanco terapéutico prometedor para el tratamiento de obesidad, ansiedad y depresión (Karila *et al.*, 2015).

De manera interesante, diferentes estrategias experimentales han permitido conocer la distribución del receptor 5-HT<sub>6</sub> por poblaciones neuronales (véase Tabla 1). Por ejemplo, mediante lesiones selectivas con la neurotoxina 192-IgG-saponina en núcleo basal magnocelular o con 5,7 dihidroxitriptamina vía intracerebroventricular se demostró que el receptor 5-HT<sub>6</sub> no se localiza en neuronas colinérgicas corticales o en neuronas serotoninérgicas, respectivamente (Gérard *et al.*, 1996; Marcos *et al.*, 2006). En un estudio reciente se examinó el patrón de expresión del mRNA del receptor 5-HT<sub>6</sub> en el cerebro de la rata mediante la técnica de doble hibridación *in situ*. En general, el mRNA de este receptor se encontró en altos niveles en neuronas espinosas medianas GABAérgicas del putamen-caudado, en el núcleo accumbens, así como el tubérculo olfatorio. Niveles moderados se encontraron en neuronas glutamatérgicas del hipocampo y en neocorteza que coexpresan el transportador de glutamato vesicular 1 (vGluT1). Además, aproximadamente el 15% de interneuronas positivas a GAD-67 también expresaron el mRNA del receptor 5-HT<sub>6</sub> siendo la mayor parte de la subpoblación de interneuronas GABAérgicas que expresan el receptor 5-HT<sub>3a</sub>, seguida de la subpoblación que expresan parvalbúmina y somatostatina. Una fracción menor de este mRNA también se encontró en interneuronas GABAérgicas positivas tanto a calbindina como a calretinina. Otra fracción más pequeña de interneuronas NPY y VIP del prosencéfalo también expresaron mRNA del receptor 5-HT<sub>6</sub> (Helboe *et al.*, 2015). En general, esta evidencia demuestra que el receptor 5-HT<sub>6</sub> se expresa en mayor cantidad en interneuronas y neuronas GABAérgicas y en menor cantidad en neuronas piramidales de corteza e hipocampo. Cabe mencionar que estudios de PCR en célula única demuestran que las interneuronas colinérgicas también expresan el receptor 5-HT<sub>6</sub> (Bonsi *et al.*, 2007) lo que sugiere que la serotonina a través de este receptor modula los circuitos estriatales locales.

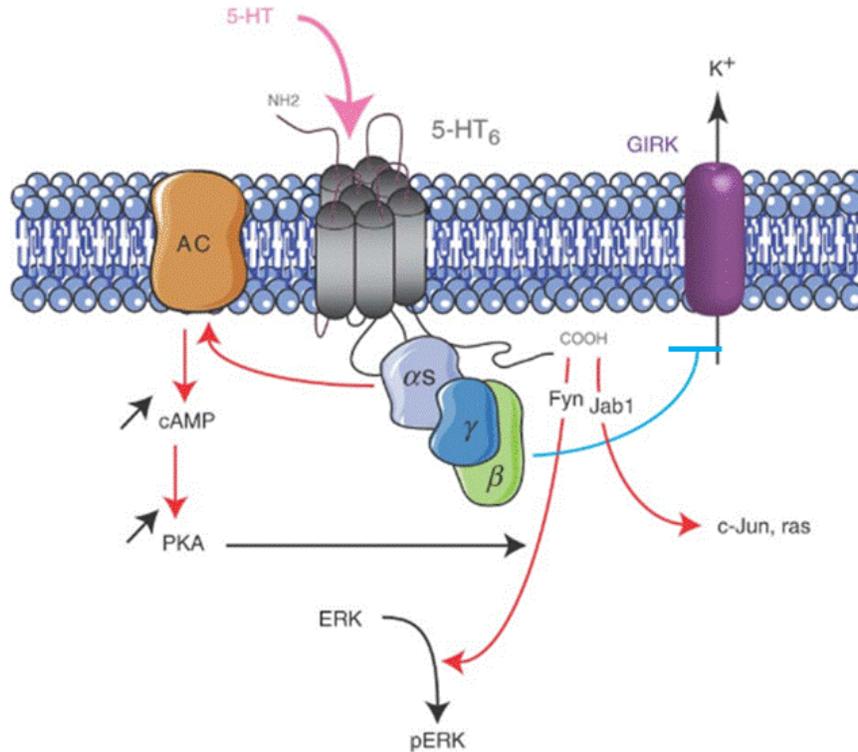
**Tabla 1. Localización del receptor 5-HT<sub>6</sub> por población neuronal.**

Manipulación experimental	Hallazgo	Conclusión	Referencia
Lesión serotoninérgica mediante la neurotoxina 5,7-dihidroxitriptamina por vía intracerebroventricular	Sin cambios significativos en los niveles de mRNA del receptor 5-HT <sub>6</sub> en núcleos del raquí dorsal	El receptor 5-HT <sub>6</sub> no se expresa en neuronas serotoninérgicas	Gérard <i>et al.</i> , (1996)
Lesión colinérgica selectiva mediante la inmunotoxina 192-IgG-saponina en núcleo basal magnocelular	No se observaron cambios en niveles de mRNA o expresión de proteína del receptor 5-HT <sub>6</sub> en corteza prefrontal deaferenciada	El receptor 5-HT <sub>6</sub> no se expresa en neuronas colinérgicas de la corteza cerebral	Marcos <i>et al.</i> , (2006)
Doble hibridación <i>in situ</i> en tejido cortical, hipocámpal, estriatal y tubérculo olfatorio	Colocalización de mRNA del receptor 5-HT <sub>6</sub> con mRNA de: GAD 67 y GAD 65, vGluT1 y vGluT2 o receptor D2 y D1. No hubo colocalización de mRNA del receptor 5-HT <sub>6</sub> con mRNA de: SERT, DAT ChAT	El receptor 5-HT <sub>6</sub> se expresa principalmente en: neuronas e interneuronas GABAérgicas de hipocampo, corteza y estriado; y en neuronas piramidales, pero no en neuronas serotoninérgicas, dopaminérgicas o colinérgicas	Helboe <i>et al.</i> , (2015)
PCR en célula individual en interneuronas de estriado	Expresión de receptor 5-HT <sub>6</sub> y ChAT	El receptor 5-HT <sub>6</sub> se expresa en interneuronas colinérgicas de estriado	Bonsi <i>et al.</i> , (2007)

### 1.8.3 Vías de señalización intracelular del receptor 5-HT<sub>6</sub>

Inicialmente el receptor 5-HT<sub>6</sub> fue descrito como un subtipo de receptor a 5-HT acoplado transduccionalmente a proteínas G $\alpha$ s por lo cual, la activación de este receptor aumenta la producción de cAMP a través de la enzima adenilato-ciclase y consecuentemente la activación de la PKA que es responsable de fosforilar a proteínas de la vía de las MAPK, en particular, la vía ERK1/2. Cabe destacar que, se reportado que el tercer bucle intracelular (iL3) del receptor 5-HT<sub>6</sub> es responsable de interactuar con la subunidad  $\alpha$  de la proteína G para mediar el aumento de la producción de cAMP (Choi *et al.*, 2007). Sin embargo, otras vías de señalización mediadas por el

receptor 5-HT<sub>6</sub> están siendo elucidadas (véase Figura 8). A continuación, se describen las vías de señalización asociadas al receptor 5-HT<sub>6</sub> que hasta la fecha han sido reportadas.



**Figura 8. Vías de señalización intracelular asociadas al receptor 5-HT<sub>6</sub>.** La activación del receptor 5-HT<sub>6</sub> activa la vía de la PKA. Además, a través del extremo -COOH el receptor 5-HT<sub>6</sub> activa a la cinasa Fyn y a la proteína Jab1. Tanto la activación de la cinasa Fyn como de la PKA resulta en la activación de ERK1/2 que regula la transcripción génica. Por otra parte, Jab1 transloca al núcleo y activa a c-Jun que también regula la transcripción génica. Así mismo, la activación del receptor 5-HT<sub>6</sub> reduce las corrientes hiperpolarizantes de K<sup>+</sup> de los canales GIRK. Otras vías de señalización se describen en el texto. Tomada de Masson *et al.*, (2012).

#### 1.8.4 Vía dependiente de Fyn

La vía dependiente de Fyn fue una de las primeras vías de señalización del receptor 5-HT<sub>6</sub> alternativa a la vía clásica (dependiente de PKA) en ser descrita. La cinasa Fyn es una proteína citosólica perteneciente a la familia de las proteínas Src. La proteína Fyn tiene la capacidad de fosforilar a diversas proteínas en residuos de Tyr. Los estudios de interacción proteína-proteína han demostrado que la activación del receptor 5-HT<sub>6</sub> con 5-HT da como resultado una asociación

física entre la región carboxilo (aminoácidos 320-440) del receptor 5-HT<sub>6</sub> y el dominio SH3, pero no SH2 de Fyn. Esta interacción resulta en la activación de Fyn que es capaz de activar a la vía ERK1/2 a través de Ras y MEK, pero no de Rap1. Además, es importante destacar que existe una regulación recíproca entre el receptor 5-HT<sub>6</sub> y Fyn, de tal forma que la expresión de Fyn aumenta la expresión del receptor 5-HT<sub>6</sub> y la activación de este receptor aumenta la actividad de Fyn (Yun *et al.*, 2007)

La significancia funcional de la interacción física región carboxilo del receptor 5-HT<sub>6</sub> y dominio SH3 de Fyn no es completamente entendida, sin embargo, tal asociación puede ser relevante para la formación de la memoria o la enfermedad de Alzheimer (Yun *et al.*, 2007) dado que la activación de Fyn es responsable de activar a la vía ERK1/2 que regula procesos de plasticidad sináptica. En este contexto, es relevante mencionar que Fyn participa en la regulación de la producción de  $\beta$ -amiloide, en la fosforilación de tau y también media los déficits sinápticos (Yang *et al.*, 2011). Por lo tanto, investigaciones futuras deberán esclarecer la contribución de Fyn tanto en condiciones fisiológicas como patológicas de la memoria.

### **1.8.5 Inhibición de canales de K<sup>+</sup>**

Los estudios de PCR en célula individual demuestran que el receptor 5-HT<sub>6</sub> se expresa en interneuronas colinérgicas de estriado y regula la excitabilidad (Bonsi *et al.*, 2007). En el estudio de Bonsi *et al.*, se reporta que la activación del receptor 5-HT<sub>6</sub> con 5-HT promueve la despolarización de la membrana y la frecuencia de disparo a través de la disminución de corrientes de K<sup>+</sup> de los canales rectificadores entrantes de K<sup>+</sup> (canales Kir3.x o GIRK). Así mismo, la inhibición de la enzima adenilato ciclasa pero no de la cinasa PKA disminuye la respuesta de despolarización inducida por 5-HT sugiriendo que la acumulación de cAMP modula la excitabilidad de las interneuronas colinérgicas (Bonsi *et al.*, 2007). En resumen, la información anterior sugiere que, la activación del receptor 5-HT<sub>6</sub> regula la excitabilidad de interneuronas colinérgicas a través de la inhibición de corrientes de K<sup>+</sup> de los canales GIRK.

### **1.8.6 Vía dependiente de Jab1**

Jab1 es una proteína localizada tanto en citoplasma como en núcleo. Los estudios de interacción de proteína-proteína han demostrado una interacción física entre la región iL3 y región carboxilo del receptor 5-HT<sub>6</sub> y la proteína Jab1 (Yun *et al.*, 2010). Esta interacción física es funcional dado

que promueve la translocación de Jab1 al núcleo para activar al factor de transcripción c-Jun (Yun *et al.*, 2010) y por lo tanto, es probable que c-Jun fosforilado regule la transcripción de genes relacionados con proliferación y apoptosis (Berridge, 2014). Por otra parte, el knockdown de Jab1 mediante siRNA específico disminuye la expresión del receptor 5-HT<sub>6</sub> lo que sugiere que Jab1 regula la expresión del receptor 5-HT<sub>6</sub>. La interacción física del receptor 5-HT<sub>6</sub> y Jab1 ha demostrado ser relevante en condiciones de hipoxia dado que promueve neuroprotección. En particular, en cultivos celulares bajo condiciones de hipoxia, las células HEK293 transfectadas con la secuencia del receptor 5-HT<sub>6</sub> muestran una mayor supervivencia celular en comparación con células HEK293 nativas sugiriendo que la sobreexpresión del receptor 5-HT<sub>6</sub> promueve supervivencia celular (Yun *et al.*, 2010). Además, Yun *et al.*, mediante un modelo de isquemia cerebral (oclusión de la arteria cerebral media en ratas) reportaron un incremento en la expresión de Jab1 y del receptor 5-HT<sub>6</sub> en corteza e hipocampo, sugiriendo que el aumento en la expresión de estas proteínas puede ser un mecanismo compensatorio para promover neuroprotección (Yun *et al.*, 2010). Consistente con la idea anterior, un estudio reciente ha demostrado que la estimulación del receptor 5-HT<sub>6</sub> promueve neuroprotección en hipocampo y además evita los déficits de memoria espacial en un modelo de demencia vascular (Yu *et al.*, 2017).

### **1.8.7 Vía dependiente de Rho-A**

Recientemente, Aatur Rahman *et al.*, mediante neuronas hipocampales transfectadas en cultivo demostraron que el receptor 5-HT<sub>6</sub> regula el tamaño y densidad de protrusiones dendríticas. De manera detallada, los autores reportaron que la estimulación del receptor 5-HT<sub>6</sub> con 5-HT o el agonista ST 1936 modifican la morfología celular de las protrusiones dendríticas. En experimentos sucesivos los autores demostraron que la vía de señalización implicada en mediar estos efectos depende de la activación de la cinasa PKA y la cinasa Rho-A (pero no de las cinasas Cdc-42 o Rac1) (Rahman *et al.*, 2017). Dado que la familia de las proteínas Rho están implicadas en la regulación de los filamentos de actina, en el estudio de Aatur Rahman *et al.*, evaluaron el estado de la cofilina, una molécula downstream de la vía de las Rho-GTPasas y encontraron que la activación del receptor 5-HT<sub>6</sub> aumenta la fosforilación de la cofilina. Además, de manera interesante, los efectos mediados por la activación del receptor 5-HT<sub>6</sub> fueron asociados a la región carboxilo terminal de los aminoácidos 321-440. En resumen, la información anterior sugiere que, la activación del receptor 5-HT<sub>6</sub> regula el tamaño y densidad de protrusiones dendríticas a través

de la vía dependiente de Rho-A-cofilina y tales efectos pueden ser relevantes para regular cambios estructurales de espinas y filopodios (Rahman *et al.*, 2017).

### **1.8.8 Vía de mTOR**

A través de análisis de proteómica Meffre *et al.*, reportaron una posible interacción entre la proteína blanco de la rapamicina en mamíferos (mTOR) y el receptor 5-HT<sub>6</sub>. Consistente con esta idea, la activación del receptor 5-HT<sub>6</sub> aumenta la actividad de mTOR en la corteza prefrontal de roedores y de manera interesante, la inhibición de mTOR por rapamicina previene el déficit cognitivo social y la discriminación de objetos nuevos inducidos por agonistas del receptor 5-HT<sub>6</sub>. Por otra parte, en modelos animales de esquizofrenia la actividad de mTOR está aumentada en corteza prefrontal y tanto el inhibidor rapamicina como antagonistas del receptor 5-HT<sub>6</sub> revierten los déficits cognitivos (Meffre *et al.*, 2012). En general, la información anterior sugiere que el aumento en la actividad de mTOR inducida por el receptor 5-HT<sub>6</sub> se relaciona positivamente con déficits cognitivos. Sin embargo, experimentos de interacción proteína-proteína son necesarios para demostrar si existe una interacción física entre el receptor 5-HT<sub>6</sub> y mTOR o si la regulación de la actividad de mTOR esta mediada por una vía indirecta.

### **1.9 Participación del receptor 5-HT<sub>6</sub> en la memoria: un potencial blanco terapéutico**

Actualmente existe un gran número de estudios que demuestran la participación del receptor 5-HT<sub>6</sub> en condiciones fisiológicas y patológicas de la memoria, la evidencia se resume en la Tabla 2. Uno de los estudios pioneros en demostrar el potencial terapéutico de los receptores 5-HT<sub>6</sub> fue realizado por Meneses (2001). En ese trabajo, se encontró que el antagonista Ro 04-6790 (5 mg/kg), uno de los primeros antagonistas en ser sintetizado por Roche, mejora la memoria asociativa y además fue capaz de revertir el efecto amnésico inducido por escopolamina en la prueba de automoldeamiento. Posteriormente, en otro estudio se reportó que la administración oral tanto aguda como crónica de los antagonistas del receptor 5-HT<sub>6</sub>, SB-357134 y SB-399885 mejoran la consolidación de la memoria en la tarea de automoldeamiento; así mismo, tanto de manera aguda como de manera crónica SB-357134 (3 y 10 mg/kg) y SB 399885 (10 mg/kg) revierten el déficit de memoria inducido por escopolamina o dizocilpina (Pérez-García y Meneses, 2005); estos efectos positivos en la memoria parecen estar mediados por un aumento en la liberación de acetilcolina y glutamato (Marcos *et al.*, 2006).

En otros estudios, la administración post-entrenamiento del antagonista del receptor 5-HT<sub>6</sub> SB-271046 (10 y 15 mg/kg) en ratas fue capaz de revertir el efecto amnésico inducido por escopolamina o dizocilpina en la prueba de condicionamiento por miedo (Woods *et al.*, 2012). También, este antagonista revirtió completamente los déficits inducidos por escopolamina tanto en la memoria de trabajo (30 mg/kg) como en la adquisición y recuperación del aprendizaje aversivo (efecto dosis dependiente) en la prueba de evitación pasiva (Da Silva Costa-Aze *et al.*, 2012). Los efectos anti-amnésicos de SB-271046 (10 mg/kg) también han sido reportados en el laberinto acuático de Morris en ratas tratadas con escopolamina o MK-801 (Marcos *et al.*, 2008). Así mismo, recientemente SLV fue sintetizado como un antagonista del receptor 5-HT<sub>6</sub> y fue evaluado en ratas, este antagonista revirtió el efecto amnésico inducido por MK-801 o escopolamina en la memoria de reconocimiento y además, mejoró tanto la memoria espacial en el laberinto en T como el aprendizaje aversivo en la prueba de evitación pasiva en ratas con administraciones de β-amiloide en hipocampo (de Bruin *et al.*, 2016).

En términos generales, la evidencia preclínica antes mencionada sugiere que el antagonismo del receptor 5-HT<sub>6</sub> representa una potencial estrategia terapéutica para el tratamiento de déficits de memoria. Sin embargo, los mecanismos neuroquímicos implicados en los efectos pro-cognitivos o anti-amnésicos del antagonismo del receptor 5-HT<sub>6</sub> son poco conocidos. En este estudio es de particular interés el antagonista del receptor 5-HT<sub>6</sub> SB-357134, el cual tiene una afinidad (pK<sub>i</sub>) de 8.5, una t<sub>1/2</sub> = 3.4 h y alcanza cerebro 30 min después de administrarse por vía oral (Bromidge *et al.*, 2001; Stean *et al.*, 2002; Pérez-García y Meneses, 2005).

### **1.9.1 Posibles mecanismos neuroquímicos implicados en los efectos promnésicos y anti-amnésicos del receptor 5-HT<sub>6</sub>**

Los estudios de microdiálisis *in vivo* han proporcionado cierta evidencia sobre los posibles mecanismos neuroquímicos de antagonistas del receptor 5-HT<sub>6</sub> mediante el cual estos antagonistas pudiesen mediar sus efectos promnésicos y anti-amnésicos.

Dawson *et al.*, mediante estudios de microdiálisis, proporcionaron la primera evidencia sobre los efectos neuroquímicos de la modulación del receptor 5-HT<sub>6</sub> en ratas en libre movimiento. Ellos encontraron que el antagonista SB-271046 (10 mg/kg s.c.) aumentó la concentración de glutamato y aspartato en corteza frontal pero no en estriado, no obstante, este antagonista no modificó los

niveles de 5-HT, noradrenalina y dopamina tanto en estriado como en corteza frontal (Dawson *et al.*, 2000). Casi de manera inmediata, también se determinó que SB-271046 aumenta los niveles de glutamato en el hipocampo dorsal (Dawson *et al.*, 2001). De manera similar, Claus Riemers *et al.*, demostraron que el antagonismo de los receptores 5-HT<sub>6</sub> aumentó los niveles de acetilcolina en corteza prefrontal (Riemer Claus *et al.*, 2003). En conjunto estos hallazgos sugirieron que, el antagonismo del receptor 5-HT<sub>6</sub> modula positivamente al sistema colinérgico y glutamatérgico en áreas relevantes para la memoria como hipocampo y corteza frontal.

**Tabla 2. Efecto de antagonistas del receptor 5-HT<sub>6</sub> sobre la memoria en diversas pruebas conductuales.**

Antagonista del receptor 5-HT <sub>6</sub>	Efecto sobre la memoria	Prueba conductual	Referencia
SB-357134	Mejora consolidación (1-30 mg/kg).	Automoldeamiento	Pérez-García y Meneses (2005)
SB 399885	Efecto anti-amnésico (1, 3 o 10 mg/kg).		
SB-271046	Anti-amnésico (10 y 15 mg/kg) Mejora la memoria espacial (10 mg/kg)	Condicionamiento por miedo Laberinto acuático de Morris	Woods <i>et al.</i> , (2012) Marcos <i>et al.</i> , (2010)
	Anti-amnésico (30 mg/kg)	Laberinto en T Evitación pasiva	Da Silva Costa-Aze <i>et al.</i> , (2012)
	Anti-amnésico (10 mg/kg).	Laberinto acuático de Morris	Marcos <i>et al.</i> , (2008)
SLV	Anti-amnésico (3-30 mg/kg) Mejora memoria espacial (30 mg/kg) Mejora la memoria de tipo aversivo (30 mg/kg)	Reconocimiento de objetos Laberinto en T Evitación pasiva	de Bruin <i>et al.</i> , (2015)
Ro 04-6790	Mejora consolidación y Anti-amnésico (5 mg/kg)	Automoldeamiento	Meneses (2001)
	Mejora la retención de memoria de reconocimiento (10 mg/kg)	Reconocimiento de objetos novedosos	King <i>et al.</i> , (2009)

Años más tarde cuando fue posible sintetizar agonistas completos y con alta afinidad por el receptor 5-HT<sub>6</sub>, Schechter *et al.*, mediante estudios de microdiálisis en ratas en libre movimiento

reportaron que WAY-181187 de manera aguda aumentó los niveles de GABA en corteza prefrontal medial, hipocampo dorsal, estriado y amígdala, mientras que, WAY-208466 de manera crónica (14 días) también aumentó los niveles de GABA en corteza frontal. De manera interesante, WAY-181187 disminuyó modesta pero significativamente los niveles de 5-HT y dopamina en corteza frontal dorsolateral (Schechter *et al.*, 2008). Colectivamente, estos hallazgos demuestran que la activación del receptor 5-HT<sub>6</sub> aumenta los niveles de GABA en regiones cortico-límbicas (Schechter *et al.*, 2008) que son relevantes para la formación de la memoria.

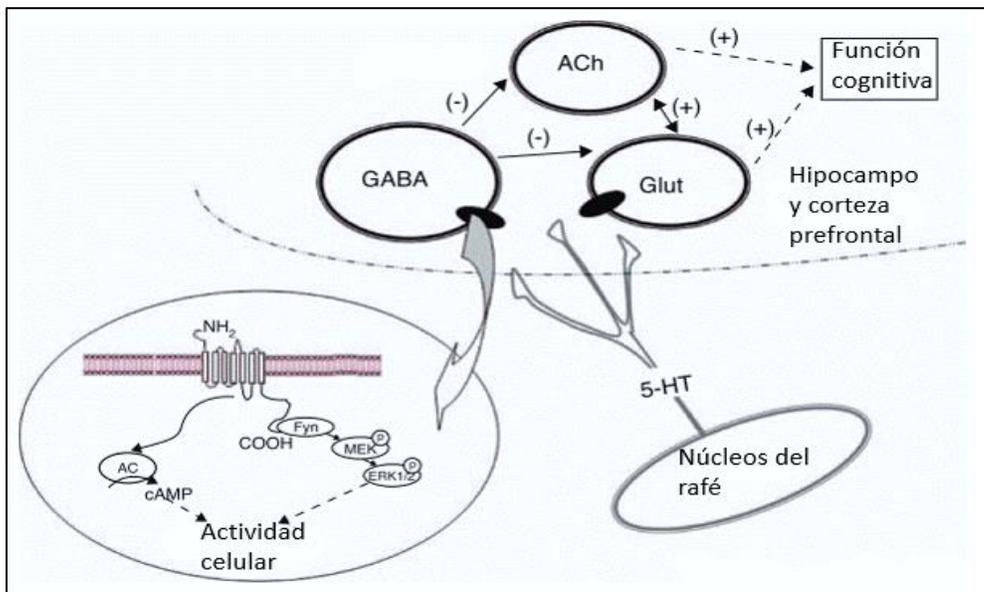
**Tabla 3. Efectos neuroquímicos de la modulación del receptor 5-HT<sub>6</sub> en regiones cortico-límbicas.**

Ligando 5-HT <sub>6</sub>	Hallazgo	Referencia
Antagonista SB-271046 (10 mg/kg s.c. aguda) en ratas	↑ glutamato y aspartato en corteza frontal, pero no en estriado.	Dawson <i>et al.</i> , (2000)
Antagonista SB-271046 (10 mg/kg s.c. aguda) en ratas	↑ glutamato en corteza prefrontal medial e hipocampo dorsal.	Dawson <i>et al.</i> , (2001)
Antagonista 4-(2-Bromo-6-pirrolidin-1-ilpiridina-4-sulfonil) fenilamina (30 mg/kg p.o. aguda) en ratas	↑ acetilcolina en corteza frontal.	Claus Riemer <i>et al.</i> , (2003)
Agonista WAY-181187 (3, 10 o 30 mg/kg s.c. aguda) en ratas	↑ GABA en corteza frontal dorsolateral, hipocampo dorsal, estriado y amígdala.	Schechter <i>et al.</i> , (2008)
Agonista WAY-208466 (10 mg/kg s.c. 14 días) en ratas	↑ GABA extracelular en corteza frontal sin cambios en niveles de glutamato.	

Actualmente, diversas compañías farmacéuticas están evaluando fármacos candidatos para el tratamiento del déficit de memoria particularmente en la enfermedad de Alzheimer. Los estudios clínicos de fase I han demostrado que diversos antagonistas del receptor 5-HT<sub>6</sub> son bien tolerados en voluntarios sanos; así, varios de estos antagonistas se han evaluado en estudios clínicos de fase II y III. Desafortunadamente, los resultados de los ensayos clínicos de fase III no han sido satisfactorios como el caso de idalopiridina cuyos resultados muestran ausencia de eficacia en pacientes con enfermedad de Alzheimer de leve a moderado tratados conjuntamente con

donepezilo (inhibidor de la acetilcolinesterasa) (Ferrero *et al.*, 2017). Estos fallos en los ensayos clínicos de fase III (Ferrero *et al.*, 2017) probablemente se deban a que aún se desconoce los mecanismos neuroquímicos mediante el cual antagonistas del receptor 5-HT<sub>6</sub> ejercen sus efectos positivos en la memoria.

Diversos autores han sugerido que los efectos promnésicos y anti-amnésicos de antagonistas del receptor 5-HT<sub>6</sub> se deben a un incremento en la actividad tanto de neuronas colinérgicas como glutamatérgicas a través de receptores 5-HT<sub>6</sub> localizados en neuronas e interneuronas GABAérgicas (véase Figura 9) (Codony *et al.*, 2011; Woods *et al.*, 2012; Helboe *et al.*, 2015), sin embargo, no hay evidencia experimental que demuestre la participación de la actividad GABAérgica en los efectos de antagonistas del receptor 5-HT<sub>6</sub> en condiciones fisiológicas como formación de memoria o condiciones patológicas como amnesia.



**Figura 9. Mecanismo neuroquímico propuesto mediante el cual el bloqueo del receptor 5-HT<sub>6</sub> evoca efectos promnésicos o anti-amnésicos.** La hipótesis propuesta sugiere que el bloqueo de los receptores 5-HT<sub>6</sub> de neuronas e interneuronas GABAérgicas de hipocampo y corteza prefrontal disminuye la liberación de GABA y consecuentemente se desinhibe a neuronas colinérgicas y glutamatérgicas cuyos neurotransmisores son responsable de mejorar la función cognitiva. Modificada de Codony *et al.*, (2011).

El mecanismo probable mediante el cual el bloqueo del receptor 5-HT<sub>6</sub> disminuye la liberación GABA se describe a continuación. En primera instancia, la activación del receptor 5-HT<sub>6</sub> en neuronas e interneuronas promueve la activación de la vía del cAMP. Además, también se ha

reportado que la activación del receptor 5-HT<sub>6</sub> disminuye las corrientes de K<sup>+</sup> de los canales GIRK responsables de la hiperpolarización de la membrana (Bonsi *et al.*, 2007). Cabe destacar que desde hace varios años, se sabe que la PKA activa a diversos canales de Ca<sup>2+</sup> en hipocampo (Hell *et al.*, 1995). Acorde a la idea anterior, recientemente, en motoneuronas del nemátodo *Caenorhabditis elegans* se demostró que la activación de la PKA fosforila diversos canales de Ca<sup>2+</sup> entre ellos los canales de tipo P/Q y tipo L que promueven el aumento intracelular de Ca<sup>2+</sup> y consecuentemente la liberación de GABA (Wang y Sieburth 2013). Por lo tanto, es posible esperar que la activación del receptor 5-HT<sub>6</sub> active la PKA y esta enzima fosforile canales de Ca<sup>2+</sup> tipo P/Q y tipo L promoviendo la entrada de Ca<sup>2+</sup> que promueve la liberación de GABA. En efecto, la estimulación del receptor 5-HT<sub>6</sub> aumenta la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular en cultivos celulares (Riccioni *et al.*, 2011).

En conjunto, los mecanismos antes mencionados contribuyen a la despolarización de la membrana, al aumento en la frecuencia de disparo y al aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular. El incremento de Ca<sup>2+</sup> intracelular permite la activación de proteínas implicadas en la exocitosis (ej. CaMKII, sinaptofisina, etc.) de GABA. Por lo tanto, el bloqueo de los receptores 5-HT<sub>6</sub> disminuye la actividad de canales de Ca<sup>2+</sup> y aumenta las corrientes K<sup>+</sup> en los canales GIRK promoviendo de esta manera la hiperpolarización de la membrana y la disminución de la liberación de GABA. En este trabajo, se estudia la participación de la actividad GABAérgica en los efectos del antagonismo del receptor 5-HT<sub>6</sub> en la memoria mediante la modulación farmacológica del transportador GAT 1. Antes de revisar la participación de GAT1 en la memoria, en primera instancia se detallan las generalidades y la participación del sistema GABAérgico en la memoria.

### **1.10 Participación del sistema GABAérgico en la memoria: Generalidades**

GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central, es responsable junto con el glutamato del balance general excitación/inhibición y también participa en la regulación de los procesos de memoria (Myhrer, 2003). Este neurotransmisor se forma a partir de la descarboxilación del glutamato mediante una enzima denominada ácido glutámico descarboxilasa (GAD) y es metabolizada a succinato mediante la acción secuencial de GABA-transaminasa (GABA-T) y succinato semialdehído deshidrogenasa (SSADH) (Martín y Rimvall, 1993). Existen dos isoformas de GAD: GAD 65 y GAD 67 cuya nomenclatura está en función del peso molecular. La enzima GAD 67 es la isoforma más ampliamente distribuida en el sistema

nervioso central. El mecanismo de recaptura de GABA esta mediado por cuatro diferentes tipos de transportadores que, en la rata se denominan GAT1-4; el principal transportador de GABA en terminales GABAélicas es el transportador GAT1 (Gonzalez-Burgos, 2010). Los efectos del neurotransmisor GABA están mediado por dos tipos de receptores, los receptores GABA<sub>A</sub> y los receptores GABA<sub>B</sub>.

### **1.10.1 Receptores GABA<sub>A</sub>**

Los receptores GABA<sub>A</sub> son canales iónicos de Cl<sup>-</sup> activado por GABA, se componen de 5 subunidades de diversas clases ( $\alpha_{1-6}$ ,  $\beta_{1-3}$ ,  $\gamma_{1-3}$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\pi$  y  $\rho_{1-3}$ ) y en la mayoría de los casos conservan una estequiometría 2:2:1 para las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , respectivamente (Rudolph y Möhler, 2006). Los receptores GABA<sub>A</sub> pueden clasificarse en dos grupos: receptores GABA<sub>A</sub> que responden al diazepam, un fármaco que se une al receptor GABA<sub>A</sub> e induce efectos tranquilizantes; y receptores GABA<sub>c</sub> que no responden al diazepam (revisado en Kim y Yoon, 2017), no obstante, esto depende de las diferentes combinaciones de las distintas subunidades.

Las propiedades farmacológicas de los receptores GABA<sub>A</sub> al igual que sus propiedades biofísicas están determinadas por la composición iónica de distintas subunidades (Farrant y Nusser, 2005). Entre los diferentes grupos farmacológicos que modulan la actividad de los receptores GABA<sub>A</sub> se encuentran: benzodiazepinas, barbituratos, etanol, neuroesteroides, anestésicos inhalados, entre otros. De estos grupos, las benzodiazepinas son las más estudiadas y son moduladores alostéricos positivos que se unen entre la subunidad  $\alpha$  y  $\gamma_2$  de receptores GABA<sub>A</sub> que contengan las subunidades  $\alpha_{1-3}$  o  $\alpha_5$  en combinación con subunidades  $\beta$  y  $\gamma_2$  (revisado en Solas, Puerta y Ramirez, 2015), en este grupo se encuentra el diazepam, el midazolam y el zolpidem. Una de las principales funciones de los receptores GABA<sub>A</sub> es mediar la inhibición tónica y fásica, como se revisa más adelante.

### **1.10.2 Receptores GABA<sub>B</sub>**

Los receptores GABA<sub>B</sub> funcionales están formado por la heterodimerización de dos subunidades de siete segmentos transmembrana denominadas GABA<sub>B1</sub> y GABA<sub>B2</sub>. El receptor GABA<sub>B</sub> regula tanto la actividad pre y postsináptica. La co-expresión de las subunidades GABA<sub>B1</sub> y GABA<sub>B2</sub> permite el transporte de la subunidad GABA<sub>B1</sub> a la membrana celular y genera un receptor funcional que puede acoplarse a vías de transducción de señales para la inactivación de canales de

$\text{Ca}^{2+}$  activados por alto voltaje ( $\text{Ca}_v2.1$  y  $\text{Ca}_v2.2$ ) o los canales rectificadores entrantes de  $\text{K}^+$  (Kir3). La subunidad  $\text{GABA}_{B1}$  alberga el sitio ortostérico de GABA mientras que la subunidad  $\text{GABA}_{B2}$  media la señalización acoplada a proteínas G. Las dos subunidades interactúan por acoplamiento alostérico tal que  $\text{GABA}_{B2}$  incrementa la afinidad de  $\text{GABA}_{B1}$  por agonistas y recíprocamente  $\text{GABA}_{B1}$  facilita el acoplamiento de  $\text{GABA}_{B2}$  a proteínas G (Bettler *et al.*, 2017).

### 1.10.3 Transmisión GABAérgica

Tradicionalmente, se ha aceptado que los efectos inhibitorios de GABA están mediados principalmente por receptores  $\text{GABA}_A$  que se localizan en contactos sinápticos, la apertura de estos canales en neuronas maduras permite la entrada de iones  $\text{Cl}^-$  y conduce a la hiperpolarización de la membrana postsináptica a través de los potenciales postsinápticos inhibitorios. En general, los efectos inhibitorios de GABA pueden denominarse fásicos o tónicos. Se considera inhibición fásica cuando el GABA liberado de vesículas presinápticas incrementa transitoriamente en la sinapsis y activa a los receptores  $\text{GABA}_A$  postsinápticos, de tal manera que el evento es espacial y temporalmente específico. En contraste, la inhibición tónica se debe a que parte del GABA sináptico difunde hacia sitios extrasinápticos y activa a receptores  $\text{GABA}_A$  localizados sobre terminales presinápticas o en sinapsis vecinas de la misma neurona o neuronas adyacentes, por tanto, una baja concentración de GABA en el espacio extracelular puede activar de manera persistente a estos receptores cuya temporalidad es distinta a la inhibición fásica. En síntesis, la principal característica de la inhibición fásica es la apertura rápida y sincrónica de un número relativamente pequeño de canales localizados en la sinapsis, mientras que, la inhibición tónica resulta de la activación de receptores temporalmente dispersos que están distribuidos sobre la superficie neuronal (Farrant y Nusser, 2005).

A pesar de la amplia heterogeneidad de los receptores  $\text{GABA}_A$ , ciertos subtipos muestran una distribución sináptica que media la inhibición fásica y una distribución extrasináptica que media la inhibición tónica. En general, aquellos receptores que contengan la subunidad  $\gamma_2$  en asociación con subunidades  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  o  $\alpha_3$  ( $\alpha_1\beta_{2/3}\gamma_2$ ,  $\alpha_2\beta_{2/3}\gamma_2$  y  $\alpha_3\beta_{2/3}\gamma_2$ ) tienen una localización sináptica mientras que, receptores que contengan la subunidad  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$  o  $\alpha_6$  ( $\alpha_6\beta_x\delta$ ,  $\alpha_4\beta_x\delta$  y  $\alpha_5\beta_x\gamma_2$ ) son predominantemente extrasinápticos (Farrant y Nusser, 2005).

Por otra parte, discriminar entre el efecto de la inhibición fásica de la inhibición tónica ha sido posible gracias al desarrollo de fármacos con modulación selectiva. Antagonistas competitivos y no competitivos GABAérgicos muestran afinidad preferencial por determinados subtipos de receptores GABA<sub>A</sub> que median la inhibición tónica y fásica. En altas concentraciones, los antagonistas selectivos de GABA<sub>A</sub> bicuculina y SR-95531 (gabazina) o el bloqueador del canal GABA<sub>A</sub> picrotoxina bloquean completamente todas las conductancias mediadas por este receptor. En el rango sub-micromolar gabazina o penicilina bloquean selectivamente las corrientes fásicas, mientras que, el diurético furosemida que también es un antagonista de los receptores GABA<sub>A</sub>, bloquea preferencialmente las corrientes tónicas dado que furosemida presenta 200 veces más selectividad por receptores que contengan la subunidad  $\alpha_6$  en comparación con receptores que contienen la subunidad  $\alpha_1$ . Finalmente, el único compuesto capaz de estimular las corrientes inhibitorias tónicas es el agonista parcial o completo 4,5,6,7-tetrahidroisotiazol-[5, 4-c]piridin-3-ol (THIP) de los receptores GABA<sub>A</sub> con composición  $\alpha_4\beta_3\gamma_2$  y  $\alpha_4\beta_3\delta$ , respectivamente (revisado en Farrant y Nusser, 2005).

### **1.11 Participación de GABA en la memoria**

Uno de los primeros trabajos en demostrar que GABA participa de manera importante en la memoria fue realizado por Katz y Liebler quienes demostraron que la administración sistémica inmediatamente después de cada ensayo de un inhibidor de GABA transaminasa deteriora la consolidación de la memoria en una prueba de evitación activa (Katz y Liebler, 1978) sugiriendo que el incremento en los niveles de GABA interfiere con el proceso de consolidación. En este contexto, dado que GABA ejerce sus efectos a través de receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub> diversos estudios han investigado su participación en los procesos de memoria. Por ejemplo, la administración post-entrenamiento intra-amígdala o sistémica de baclofeno, un agonista de los receptores GABA<sub>B</sub> en ratas deteriora la retención de la memoria en la prueba de evitación pasiva y en la prueba de respuesta emocional condicionada (Castellano *et al.*, 1989). De manera similar, Zarrindast *et al.*, utilizando la prueba de evitación pasiva observaron que la activación hipocampal de receptores GABA<sub>A</sub> (por muscimol) y GABA<sub>B</sub> (por baclofeno) deteriora la retención de la memoria (Zarrindast *et al.*, 2002). Por otra parte, diazepam en humanos deteriora el aprendizaje o la adquisición de la memoria de corto plazo (Ghoneim y Mewaldt, 1977), del mismo modo, otra benzodiazepina lorazepam deteriora la memoria verbal en sujetos sanos (Preston *et al.*, 1988).

En contraste a la activación de receptores GABAérgicos, la reducción de su actividad a través de antagonistas o agonistas inversos ha mostrado efectos opuestos. Por ejemplo, CGP 36742 un antagonista de los receptores GABA<sub>B</sub> mejora la memoria en ratones, ratas y monos en diversas pruebas conductuales (evitación pasiva, reconocimiento social y condicionamiento visuo-espacial) (Mondadori, Jaekel y Preiswerk, 1993), además, otro antagonista del receptor GABA<sub>B</sub> CGP 35348 revierte el efecto amnésico de escopolamina en la prueba de evitación pasiva (Bianchi y Panerai, 1993). De manera similar, el bloqueo del receptor GABA<sub>A</sub> con flumazenil (modulador alostérico negativo del sitio de unión de las benzodiazepinas) o CGS 8216 (agonista inverso) mejoran la memoria espacial en ratas (McNamara y Skelton, 1993).

En resumen, la participación del sistema GABAérgico en la memoria permite obtener ciertas conclusiones generales, entre ellas: fármacos que facilitan la neurotransmisión GABAérgica a través de la activación de receptores GABA<sub>A</sub> o GABA<sub>B</sub> deterioran la memoria en modelos animales y en humanos; y fármacos que reducen la neurotransmisión GABAérgica a través del bloqueo de receptores GABA<sub>A</sub> (Brioni, 1993) o GABA<sub>B</sub> facilitan la memoria. Lo anterior sugiere que, los niveles de GABA endógeno deben estar altamente regulados para modular los procesos de memoria y es importante señalar que uno de los principales mecanismos de regulación de GABA es a través de la recaptura mediada por los transportadores de GABA.

### **1.11.1 El Transportador GAT1: Estructura, localización y función**

El transportador GAT1 es una proteína formada por 599 aminoácidos con 12 dominios transmembrana cuya función principal es la recaptura de GABA por un mecanismo dependiente de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>. Este transportador es codificado por el gen *slc6a1* y pertenece a la familia de transportadores de membrana SLC6. Estudios de microscopia electrónica indican que GAT1 se expresan principalmente en la membrana plasmática de neuronas y en menor medida en células gliales, específicamente en terminales GABAérgicas y procesos gliales cercanos a sinapsis GABAérgicas (Gonzalez-Burgos, 2010).

Además de la recaptura de GABA sináptico, diversas funciones han sido asociadas al transportador GAT1. Por ejemplo, en la región CA1 del hipocampo de ratones, la inhibición farmacológica o la delección génica de GAT1 bloquea de manera específica la LTP inducida por la estimulación en ráfaga teta que se relaciona con déficits de memoria (Gong *et al.*, 2009) lo que

sugiere que GAT1 en hipocampo regula de manera precisa los niveles de GABA para el correcto funcionamiento de la oscilación teta y así inducir la LTP.

### **1.11.2 Participación de GAT1 en la memoria**

Los modelos genéticos en ratones han permitido conocer en cierta medida la función del transportador GAT1 en el aprendizaje y la memoria. En este sentido, se ha reportado que ratones *knock-out* para GAT1 muestran un deterioro del aprendizaje y memoria en la prueba de laberinto acuático de Morris en comparación con ratones wild-type (Gong *et al.*, 2009), así mismo, la sobreexpresión de GAT1 en ratones deteriora el aprendizaje asociativo y la memoria de reconocimiento (Hu *et al.*, 2004).

En otro estudio, mediante el uso de ratones heterocigotos GAT1<sup>+/-</sup> se demuestra que este genotipo mejora el rendimiento cognitivo en la prueba de evitación pasiva y el laberinto acuático de Morris, en el caso de la prueba de evitación pasiva los ratones GAT1<sup>+/-</sup> muestran un incremento significativo en la latencia de retención en comparación con ratones wild-type, mientras que, ratones homocigotos GAT1<sup>-/-</sup> muestran una disminución significativa en la latencia de retención; en resumen estos resultados indican que la expresión heterocigota de GAT1 (reducción en la expresión de GAT1) mejora la memoria dependiente del hipocampo y que cierto aumento en la activación de la transmisión GABAérgica es responsable de estos efectos sobre la memoria (Shi *et al.*, 2012).

Consistente con los estudios genéticos, los estudios farmacológicos a nivel preclínico también sugieren que el transportador GAT1 participa de manera importante en el aprendizaje y la memoria. Por ejemplo, NNC-711 (0.5 y 1 mg/kg) un inhibidor selectivo (IC<sub>50</sub>= 0.38 μM, con una t<sub>1/2</sub>= 7-9 h y 30 min en alcanzar cerebro por vía i.p.) del transportador GAT1 fue capaz de revertir el efecto amnésico inducido por escopolamina en la prueba de evitación pasiva; además, la administración diaria de NNC-711 (0.5 y 1.5 mg/kg) inmediatamente antes del aprendizaje espacial reduce de manera significativa la latencia de escape en el laberinto acuático de Morris tanto en ratas adultas como envejecidas; estos resultados sugieren el potencial de los inhibidores de GAT como agentes anti-amnésicos y aumentadores de la cognición (O'Connell *et al.*, 2001). Recientemente, Salat *et al.*, reportaron en ratones que el inhibidor de GAT1 tiagabina (dosis de 10 y 30 mg/kg) no revierte el déficit de retención inducido por escopolamina en la prueba de

evitación pasiva, sin embargo, tiagabina (10 mg/kg) fue capaz de revertir este efecto amnésico en el laberinto acuático de Morris-radial (Salat *et al.*, 2015). No obstante, también se han encontrado efectos opuestos donde ratones tratados diariamente con tiagabina (20 mg/kg) exhiben un deterioro en los ensayos de adquisición de memoria espacial en el laberinto acuático de Morris (Schmitt y Hiemke, 2002). En síntesis, tanto los estudios genéticos como farmacológicos sugieren que la regulación de los niveles de GABA en la sinapsis a través de GAT1 son responsables de los efectos observados sobre la memoria.

Por otra parte, también se ha reportado que en la amnesia o la formación de la memoria en la prueba de automoldeamiento, GAT1 muestra patrones de expresión específicos en áreas asociadas a la memoria. En la formación de la memoria, la expresión de GAT1 aumenta en corteza prefrontal y disminuye en hipocampo y estriado; mientras que, en condiciones de amnesia, la expresión de GAT1 disminuye en hipocampo y estriado, pero no en corteza prefrontal. Estos datos indican que el transportador GAT1 está asociado a patrones de expresión específicos en condiciones fisiológicas y patológicas de la memoria (Tellez *et al.*, 2012) y que probablemente estos patrones de expresión estén en función de los requerimientos de GABA en distintas estructuras cerebrales y distintas condiciones de memoria, ya sean fisiológicas o patológicas.

### **1.12 Paradigma de automoldeamiento**

El automoldeamiento es una prueba conductual que permite estudiar la memoria declarativa mediada por el hipocampo y la formación de hábitos mediada por el estriado. En esta prueba, un animal privado de alimento es colocado en una cámara de condicionamiento para encontrar pellets de comida [estímulo incondicionado (EI)] en una determinada zona de alimentación. Posteriormente, se da un par secuencial de estímulos pavlovianos (estímulo-estímulo), como una señal luminosa o una palanca retráctil iluminada [estímulo condicionado (EC)] y entrega de comida (EI). Después de un número de determinadas presentaciones EC-EI, el animal se centra en el EC y emite una respuesta instrumental [respuesta automoldeada o condicionada (RC)] tales como presión de palanca o contacto al nose-poke (compartimiento cuya función es proporcionar el EC). En este sentido, un incremento o disminución en el número de RC en los animales se considera como una mejoría o deterioro de la memoria, respectivamente. Considerablemente, la respuesta al nose-poke comparada con la respuesta de presión de palanca es más fácil de aprender en el caso de roedores debido a que es una condición más “natural” a sus patrones conductuales (Meneses,

2003; Aparicio-Nava *et al.*, 2018). En general, la prueba de automoldeamiento permite estudiar distintos procesos de memoria y evaluar el efecto de diversas manipulaciones farmacológicas en la memoria.

## **2. JUSTIFICACIÓN**

Actualmente, el antagonismo del receptor 5-HT<sub>6</sub> figura como una potencial estrategia terapéutica para el tratamiento de los déficits de memoria; no obstante, los mecanismos neuroquímicos implicados son poco conocidos. Diversos estudios sugieren que estos antagonistas ejercen sus efectos positivos sobre la memoria a través de la disminución de la actividad GABAérgica de neuronas e interneuronas, sin embargo, a la fecha no hay evidencia que lo demuestre. Por otra parte, evidencia experimental sugiere que la modulación negativa del transportador GAT1 puede afectar diferencialmente a la memoria. Por lo tanto, estudiar el efecto de la combinación del antagonismo del receptor 5-HT<sub>6</sub> y de la inhibición del transportador GAT1 en la formación de la memoria y la amnesia puede dilucidar la participación de GABA en los efectos de antagonistas del receptor 5-HT<sub>6</sub> en distintas condiciones de memoria.

## **3. HIPÓTESIS**

La inhibición farmacológica del transportador GAT1 evita los efectos promnésicos y anti-amnésicos del antagonismo del receptor 5-HT<sub>6</sub>.

## **4. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de la inhibición del transportador GAT1 sobre el antagonismo del receptor 5-HT<sub>6</sub> en la formación de la memoria y la amnesia.

## **5. OBJETIVOS PARTICULARES**

Mediante la prueba de automoldeamiento determinar el efecto de la administración sistémica de:

1. Un antagonista del receptor 5-HT<sub>6</sub> y de un inhibidor selectivo del transportador GAT1 en la memoria de corto y largo plazo.
2. Un antagonista del receptor 5-HT<sub>6</sub> y de un inhibidor del transportador GAT1 en modelos de amnesia inducido por escopolamina o dizocilpina.

3. La combinación de un antagonista del receptor 5-HT<sub>6</sub> y de un inhibidor selectivo de GAT1 en la memoria de corto y largo plazo.
4. La combinación de un antagonista del receptor 5-HT<sub>6</sub> y de un inhibidor selectivo de GAT1 en un modelo de amnesia inducido por escopolamina o dizocilpina.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Animales**

Se utilizaron ratas Wistar machos de 12-15 semanas de edad procedentes del bioterio del Cinvestav unidad Coapa. Las ratas se mantuvieron bajo las siguientes condiciones de laboratorio: grupos de 6 a 7 animales por caja, ciclo luz-oscuridad de 12 horas (la luz se encendía a las 7:00 am), temperatura constante de  $23 \pm 1$  °C, agua y alimento (LabDiet 5008) *ad libitum*. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con los lineamientos del comité interno para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la institución considerando la NOM-062-1999.

### **6.2 Restricción de alimento**

Los animales fueron sometidos a una reducción gradual de alimento durante 5-6 días hasta alcanzar el 85% de su peso inicial. Una vez alcanzado el peso deseado, este se mantuvo permitiendo que los animales se alimentaran por un periodo de 30 minutos *ad libitum* durante todos los días de experimentación. Al finalizar los experimentos los animales fueron sacrificados con CO<sub>2</sub>.

### **6.3 Paradigma de automoldeamiento**

La prueba conductual de automoldeamiento fue utilizada para evaluar MCP y MLP. Esta prueba ha sido descrita a detalle por Meneses (2003), véase el apartado “paradigma de automoldeamiento” en la sección de introducción.

La prueba de automoldeamiento se realizó en cámaras operantes de condicionamiento (Coulbourn Instruments, Lehigh Valley, PA) cuyas dimensiones internas son: 25 cm de ancho, 29 cm de longitud y 25 cm de altura. El control y registro de las cámaras se realizó mediante el software WinLinc versión 3.002. Las cámaras estuvieron equipadas con un comedero (zona de alimentación) y una fotocelda que detectó el número de contactos al comedero. Las respuestas condicionadas fueron registradas mediante el operando nose-poke, el cual es un complemento

adaptado a la cámara operante y consiste en un orificio donde la rata puede introducir su nariz como resultado de la exploración o aprendizaje.

### **6.3.1 Fase de entrenamiento**

Cada rata se colocó dentro de una cámara experimental por un periodo de 10 a 15 minutos teniendo acceso a 59 pellets de comida (45 mg cada uno) previamente depositados en el comedero. Una vez que la rata comió todos los pellets y registró 150 contactos al comedero (contabilizados con una fotocelda), inició una sesión de 10 ensayos, cada ensayo consistió en la presentación de la iluminación del operando nose-poke (estímulo condicionado, EC) por un periodo de 8 segundos seguida de la entrega de un pellet de comida (estímulo incondicionado, EI), el tiempo entre ensayos fue de 60 s. Si el animal introducía la nariz en el momento que el nose-poke se encontraba iluminado, este se apagaba e inmediatamente se entregaba el pellet de comida; a la asociación EC-EI se le consideró como una respuesta condicionada (RC). El aumento o disminución en el número de RC fue indicativo de una mejora o un deterioro de la memoria, respectivamente.

### **6.3.2 Fase de prueba: Evaluación de memoria de corto y largo plazo**

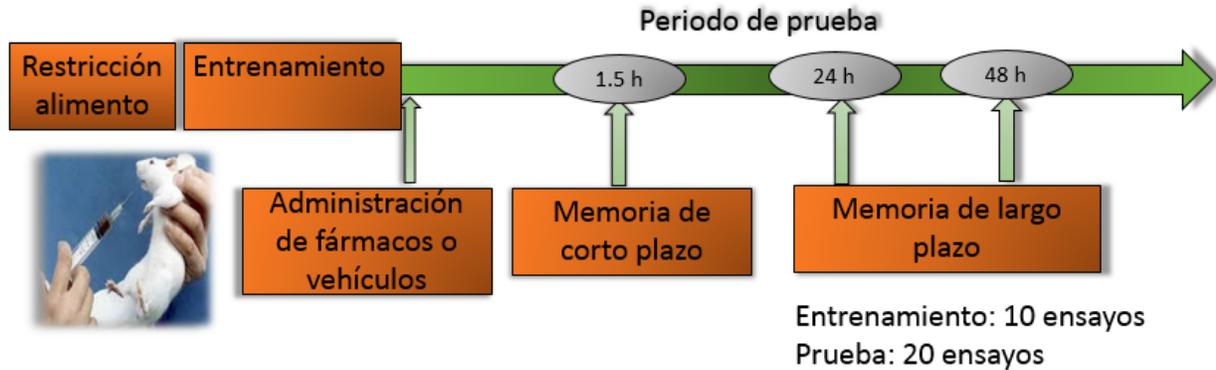
Inmediatamente después de la fase de entrenamiento, los animales recibieron tratamiento farmacológico o vehículo correspondiente y nuevamente entraron a las cámaras operantes para evaluar la memoria de corto plazo (1.5 h post-entrenamiento) y la memoria de largo plazo (24 y 48 h post-entrenamiento). En cada caso, la prueba consistió en 20 ensayos como se describió anteriormente y el resultado se presenta como % RC.

## **6.4 Fármacos**

Se utilizaron los siguientes fármacos: 1) dizocilpina (i.p.) un antagonista no competitivo del receptor NMDA, 2) escopolamina (i.p.) un antagonista no selectivo de los receptores muscarínicos, estos compuestos son utilizados para modelar amnesia, 3) SB-357134 (p.o.) un antagonista del receptor 5-HT<sub>6</sub>, y 4) NNC-711 (i.p.) un inhibidor selectivo del transportador GAT1. Todos los fármacos, con excepción de SB-357134, se disolvieron en solución salina y se administraron en un volumen de 1 ml/kg. En el caso de SB-357134, se disolvió en metilcelulosa al 25% y se administró en un volumen de 2 ml/kg.

## 6.5 Diseño experimental

En la Figura 10 se representa el diseño experimental para evaluar los distintos tratamientos farmacológicos o vehículos correspondientes en la prueba de automoldeamiento.

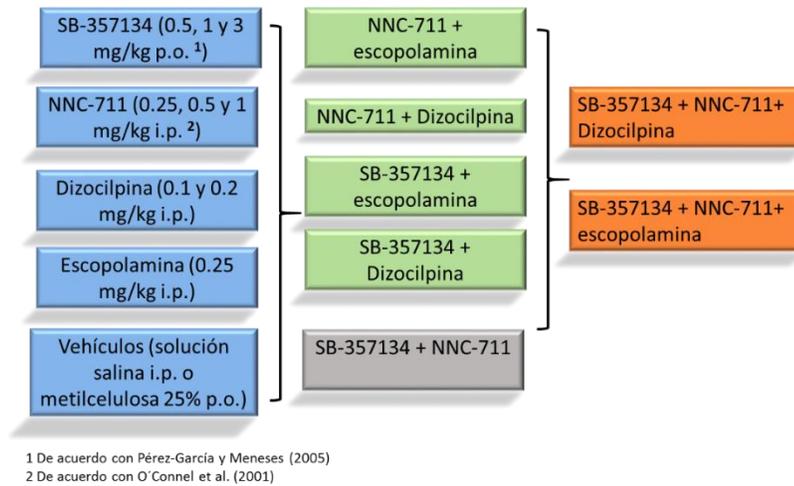


**Figura 10. Diseño experimental general de trabajo.** La prueba de automoldeamiento consta de dos sesiones: entrenamiento (10 ensayos) y prueba (20 ensayos). Los animales son sometidos inicialmente a la sesión de entrenamiento. Inmediatamente después del entrenamiento los animales reciben el tratamiento farmacológico o vehículo correspondiente y a las 1.5 h son sometidos a la sesión de prueba para evaluar memoria de corto plazo; a las 24 y 48 h post-entrenamiento nuevamente los animales son sometidos a la prueba de automoldeamiento para evaluar la memoria de largo plazo.

## 6.6 Grupos experimentales

En la Figura 11 se muestran los diferentes tratamientos farmacológicos utilizados para evaluar su efecto en la formación de la memoria en la prueba de automoldeamiento. Inicialmente, se caracterizó el efecto de cada uno de los fármacos de manera individual en el protocolo de formación de la memoria: SB-357134 (0.5, 1 y 3 mg/kg; dosis basadas del estudio de Pérez-García y Meneses, 2005), NNC-711 (0.25, 0.5 y 1 mg/kg; dosis basadas en el estudio de O'Connell *et al.*, 2001), escopolamina (0.25 mg/kg) y dizocilpina (0.1 y 0.2 mg/kg). Una vez superado lo anterior, se procedió a combinar NNC-711 + escopolamina o dizocilpina para determinar el efecto de la inhibición de GAT1 en modelos de amnesia y, de igual manera, se evaluó la combinación de SB-357134 + escopolamina o dizocilpina para validar el efecto anti-amnésico de SB-357134. Posteriormente, se procedió a evaluar el efecto de la coadministración de SB-357134 + NNC-711 para determinar si el aumento de GABA extracelular a través de la inhibición de GAT1 modifica la respuesta de SB-357134.

Por último, en experimentos de triple coadministración se evaluó el efecto de SB-357134 + NNC-711 + dizocilpina o escopolamina para determinar si el efecto anti-amnésico de SB-357134 se modifica por la inhibición de GAT1. El intervalo entre administraciones farmacológicas fue de 5 minutos. El orden de administración en experimentos de combinación es idéntico al orden de presentación de una combinación, por ejemplo, SB-357134 + NNC-711 indica que primero se administró SB-357134 y posteriormente NNC-711.



**Figura 11. Grupos farmacológicos a evaluar en el protocolo de formación de la memoria en la prueba de automoldeamiento.** Los recuadros azules muestran los grupos farmacológicos correspondientes al primer objetivo particular, los recuadros verdes corresponden al segundo objetivo particular, el recuadro gris al tercer objetivo y finalmente los recuadros naranjas corresponden al cuarto objetivo particular.

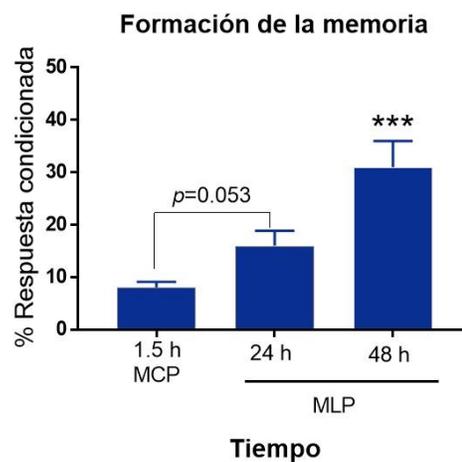
### 6.7 Análisis estadístico

Los resultados se presentan como la media  $\pm$  error estándar de % respuesta condicionada (% RC) de 7 a 10 animales por grupo experimental. Para la comparación de grupos en cada tiempo (1.5, 24 o 48 h) se utilizó un ANOVA de una vía. Se utilizó una prueba *post hoc* de Dunnett cuando se realizaron comparaciones con respecto a un grupo control, mientras que, la prueba *post hoc* Tukey se usó para comparaciones múltiples entre grupos. Como criterio de significancia se utilizó un valor de  $p < 0.05$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Formación de la memoria en la prueba de automoldeamiento

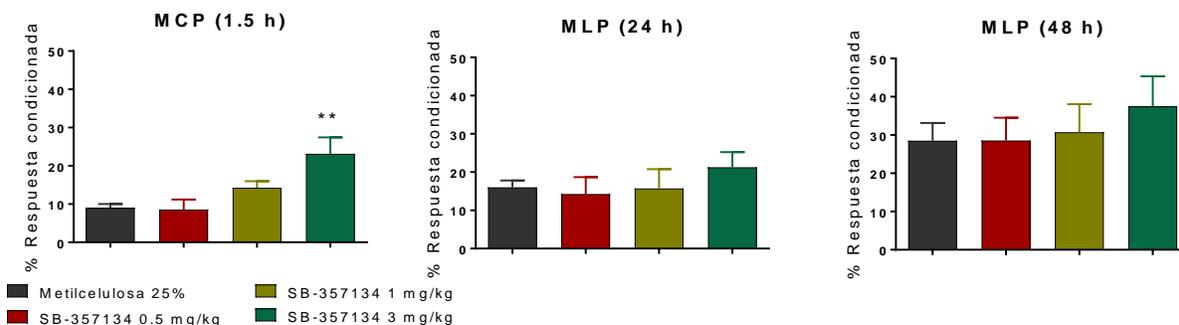
La formación de la memoria en la prueba de automoldeamiento es un proceso de aprendizaje progresivo dependiente del tiempo (véase **Figura 12**). Durante la memoria de corto plazo (MCP) los animales mostraron una media de  $8 \pm 1.1$  % RC y de manera paulatina durante la memoria de largo plazo (MLP); la respuesta aumentó a  $16 \pm 2.87$  % RC y  $31 \pm 4.9$  % RC a las 24 y 48 h, respectivamente. Una mejora significativa en la memoria se observó a las 48 h con respecto a las 1.5 h ( $p < 0.001$ ).



**Figura 12. Formación de la memoria en la prueba de automoldeamiento.** Los animales mostraron un aumento progresivo en el % RC durante la MCP y la MLP. Los resultados representan la media  $\pm$  error estándar de % RC de los animales. ANOVA de una vía.  $p < 0.001$  vs 1.5 h.  $n = 10$ .

### 7.2 Efecto del antagonismo del receptor 5-HT<sub>6</sub> en la formación de la memoria

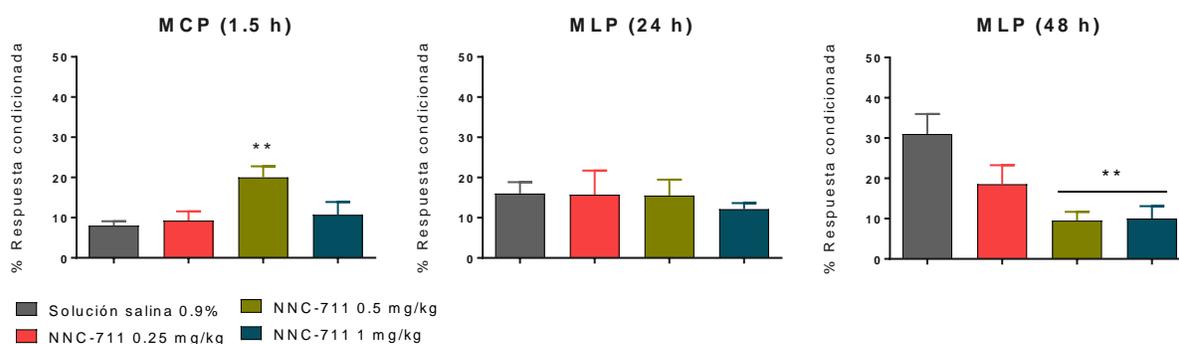
La administración post-entrenamiento del antagonista del receptor 5-HT<sub>6</sub> SB-357134 en dosis de 3 mg/kg aumentó de manera significativa el % RC ( $23.13 \pm 4.32$ ) en la MCP vs el grupo tratado con vehículo ( $9 \pm 1$  % RC) ( $p < 0.01$ ) (véase **Figura 13**). En contraste, en la MLP ninguna de las dosis evaluadas de SB-357134 (0.5-3 mg/kg) mostraron efectos significativos sobre la memoria con respecto al grupo tratado con el vehículo metilcelulosa 25 %. Estos resultados sugieren que el antagonismo del receptor 5-HT<sub>6</sub> mejora la MCP, un resultado que hasta ahora no ha sido reportado en la prueba de automoldeamiento.



**Figura 13. Efecto de SB-357134 en la formación de la memoria en la prueba de automoldeamiento.** El antagonismo del receptor 5-HT<sub>6</sub> con SB-367134 en dosis de 3 mg/kg mejoró la MCP, pero no la MLP. Los resultados representan la media  $\pm$  error estándar de % RC. ANOVA de una vía, *post hoc* Dunnett; \*\* $p < 0.01$  vs metilcelulosa 25%. n=7-10.

### 7.3 Efecto de la inhibición de GAT1 en la formación de la memoria

Para evaluar el efecto de la inhibición de GAT1 en la formación de la memoria, se utilizó al inhibidor selectivo de GAT1 NNC-711, compuesto que ya ha sido evaluado en diferentes paradigmas de memoria (O'Connell *et al.* 2001). Se evaluó NNC-711 en dosis de 0.25, 0.5 y 1 mg/kg y se encontró que NNC-711 en dosis de 0.5 mg/kg en MCP aumenta de manera significativa el % RC ( $20 \pm 2.78$  % RC) vs el grupo tratado con vehículo solución salina ( $8 \pm 1.1$  % RC;  $p < 0.05$ ) (véase **Figura 14**).

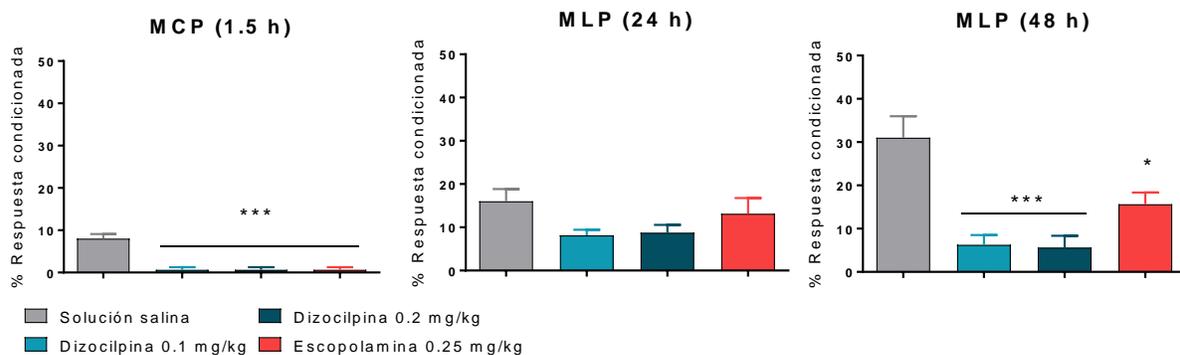


**Figura 14. Efecto de NNC-711 en la formación de la memoria en la prueba de automoldeamiento.** El inhibidor de GAT1 NNC-711 afectó diferencialmente a la memoria, en dosis de 0.5 mg/kg mejoró la MCP mientras que, en dosis de 0.5 o 1 mg/kg deterioró la MLP a las 48 h post-entrenamiento. Los resultados representan la media  $\pm$  error estándar de % RC. ANOVA de una vía, *post hoc* Dunnett; \*\* $p < 0.01$  vs solución salina. n=7-10.

En contraste, a las 24 h no se observaron diferencias significativas, pero a las 48 h NNC-711 en dosis de 0.5 ( $9.5 \pm 2.16$  % RC) y 1 mg/kg ( $10 \pm 3$  % RC) mostró un efecto amnésico dado que ambas dosis disminuyeron de manera significativa el % RC vs el grupo control ( $31 \pm 4.9$ )  $p < 0.01$ . Estos hallazgos sugieren que la inhibición de GAT1 afecta diferencialmente a la formación de la memoria de manera tiempo-dependiente.

#### 7.4 Inducción de amnesia por hipofunción colinérgica e hipofunción glutamatérgica en la formación de la memoria

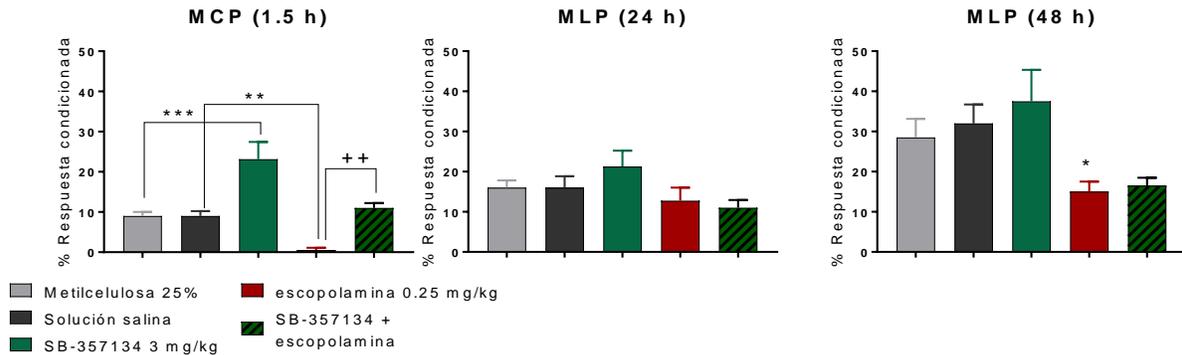
En este estudio se evaluaron los compuestos amnésicos escopolamina y dizocilpina cuyo efecto es mediado por una hipofunción colinérgica y una hipofunción glutamatérgica, respectivamente. Las medias del %RC en el orden 1.5 h, 24 h y 48 h de los siguientes grupos fueron: dizocilpina (0.1 mg/kg)  $0.62 \pm 0.62$ ,  $8.12 \pm 1.3$  y  $6.25 \pm 2.26$ ; dizocilpina (0.2 mg/kg)  $0.62 \pm 0.62$ ,  $8.75 \pm 1.83$  y  $6.62 \pm 2.74$ ; y escopolamina (0.25 mg/kg)  $0.62 \pm 0.62$ ,  $13.13 \pm 3.65$  y  $15 \pm 2.74$ . El compuesto dizocilpina en dosis de 0.1 y 0.2 mg/kg disminuyó significativamente el % RC tanto en la MCP ( $p < 0.001$ ) como a las 48 h de la MLP ( $p < 0.001$ ) con respecto al grupo control correspondiente. De manera similar, estos efectos también fueron observados en el grupo tratado con escopolamina en dosis de 0.25 mg/kg (véase **Figura 15**). En síntesis, estos hallazgos validan que escopolamina y dizocilpina en las dosis evaluadas simulan amnesia en la prueba de automoldeamiento.



**Figura 15. Efecto de escopolamina y dizocilpina en la formación de la memoria en la prueba de automoldeamiento.** Tanto escopolamina como dizocilpina disminuyeron significativamente el % RC en MCP y MLP (48 h) elucidando un efecto amnésico. ANOVA de una vía, *post hoc* Dunnett;  $*p < 0.05$  o  $***p < 0.001$  vs solución salina. n=8 o 10.

## 7.5 Efecto del antagonismo del receptor 5-HT<sub>6</sub> en un modelo de amnesia inducido por escopolamina

Para determinar el posible efecto anti-amnésico del bloqueo del receptor 5-HT<sub>6</sub> en un modelo de hipofunción colinérgica, se evaluó el efecto de la combinación SB-357134 (3 mg/kg) y escopolamina (0.25 mg/kg) dado que en experimentos previos tales dosis se encontraron como dosis efectivas. Acorde a lo esperado, SB-357134 evitó el efecto amnésico inducido por escopolamina ( $p < 0.01$ ). De manera interesante, este efecto anti-amnésico solo se observó en la MCP, no se encontraron efectos significativos en la MLP (véase **Figura 16**). En síntesis, bajo nuestras condiciones experimentales, tales resultados validan que el bloqueo del receptor 5-HT<sub>6</sub> evita los efectos amnésicos inducidos por escopolamina en la MCP.

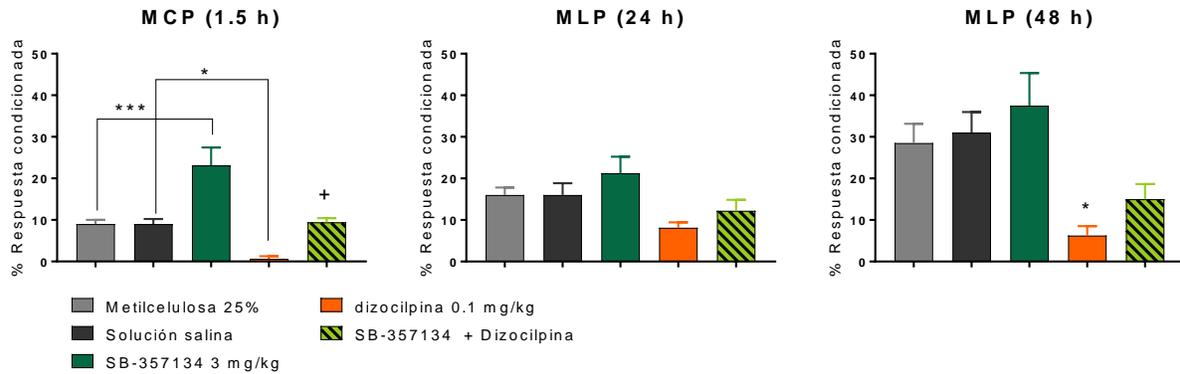


**Figura 16. Efecto de SB-357134 en un modelo de amnesia inducido por escopolamina en la prueba de automoldeamiento.** SB-357134 (3 mg/kg) evitó el efecto amnésico inducido por escopolamina en la MCP, pero no en MLP. ANOVA de una vía, *post hoc* Tukey; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  o \*\*\* $p < 0.001$  vs vehículo correspondiente; ++ $p < 0.01$  vs escopolamina 0.25 mg/kg.  $n = 8$  o  $10$ .

## 7.6 Efecto del antagonismo del receptor 5-HT<sub>6</sub> en un modelo de amnesia inducido por dizocilpina

Para determinar el posible efecto anti-amnésico del bloqueo del receptor 5-HT<sub>6</sub> en un modelo de amnesia por hipofunción glutamatérgica, se evaluó el efecto de la combinación SB-357134 (3 mg/kg) y dizocilpina (0.1 mg/kg) dado que previamente tales dosis mostraron efectos significativos sobre la memoria. Tal como se esperaba, SB-357134 mostró un efecto anti-amnésico. En particular, SB-357134 (3 mg/kg) evitó el efecto amnésico inducido por dizocilpina en la MCP ( $p < 0.05$ ), pero no en la MLP, no obstante, el grupo tratado con SB-357134 mostró una

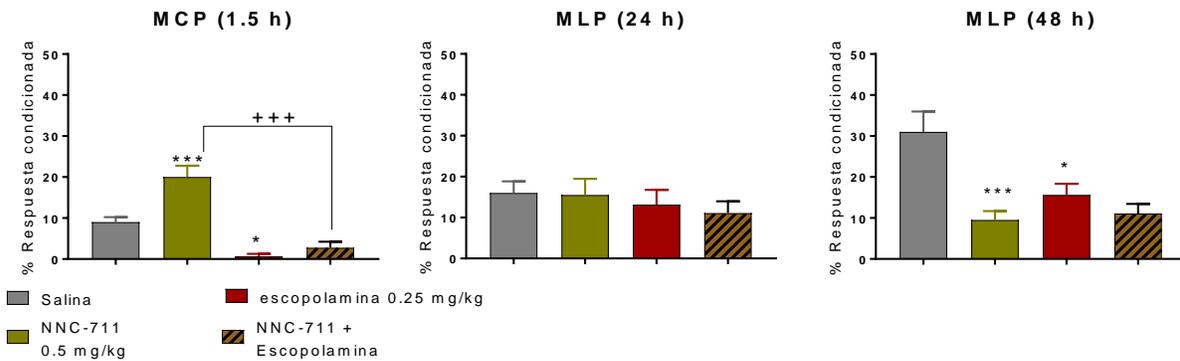
clara tendencia a aumentar el % RC durante las 24 y 48 h en comparación con el grupo tratado con dizocilpina (véase **Figura 17**). Estos hallazgos indican que el bloqueo del receptor 5-HT<sub>6</sub> evita el efecto amnésico inducido por dizocilpina en la MCP.



**Figura 17. Efecto de SB-357134 en un modelo de amnesia inducido por dizocilpina en la prueba de automoldeamiento.** SB-357134 (3 mg/kg) evitó el efecto amnésico inducido por dizocilpina en la MCP, pero no en MLP. ANOVA de una vía, *post hoc* Tukey; \* $p < 0.05$  o \*\*\* $p < 0.001$  vs vehículo correspondiente; + $p < 0.05$  vs dizocilpina 0.1 mg/kg. n=8 o 10.

### 7.7 Efecto de la inhibición de GAT1 en un modelo de amnesia inducido por escopolamina

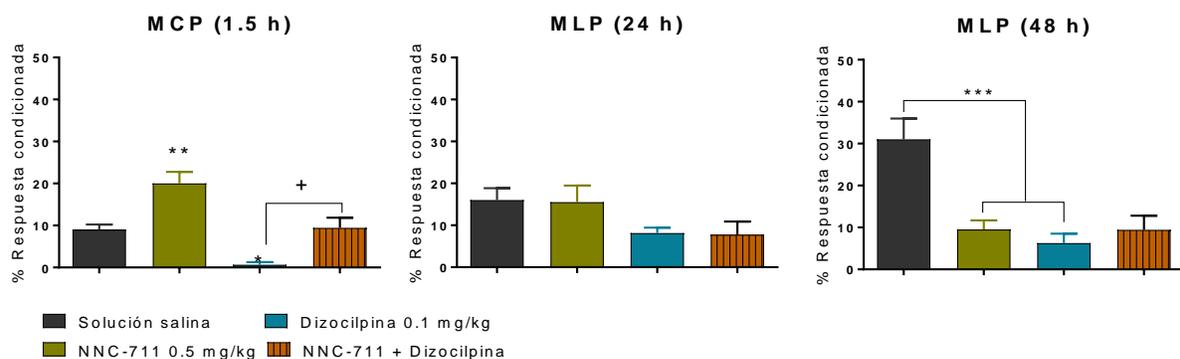
En experimentos de interacción, para determinar el efecto de la inhibición de GAT1 en un modelo de hipofunción colinérgica, se evaluó el efecto de la combinación de NNC-711 (0.5 mg/kg) y escopolamina (0.25 mg/kg) en la prueba de automoldeamiento. En la MCP, NNC-711 no evitó el efecto amnésico inducido por escopolamina. Sin embargo, la combinación NNC-711 + escopolamina mostró una disminución significativa con respecto al grupo tratado con NNC-711 (0.5 mg/kg;  $p < 0.001$ ) (véase **Figura 18**). Además, esta combinación no mostró diferencias significativas respecto a NNC-711 o escopolamina tanto a las 24 como 48 h post-entrenamiento. Estos hallazgos indican una interacción entre la neurotransmisión colinérgica y GABAérgica durante la MCP.



**Figura 18. Efecto de la inhibición de GAT1 en un modelo de amnesia inducido por escopolamina en la prueba de automoldeamiento.** La combinación NNC-711 (0.5 mg/kg) + escopolamina (0.25 mg/kg) no evitó el efecto amnésico de escopolamina en MCP ni a las 48 h de la MLP. Los resultados representan la media  $\pm$  error estándar de % RC. ANOVA de una vía, *post hoc* Tukey; \* $p < 0.05$  o \*\*\* $p < 0.001$  vs salina; +++ $p < 0.001$  vs NNC-711 0.5 mg/kg. n=8-10.

### 7.8 Efecto de la inhibición de GAT1 en un modelo de amnesia inducido por dizocilpina

Para determinar el efecto de la inhibición de GAT1 en un modelo de amnesia por hipofunción glutamatérgica, se evaluó el efecto de la combinación NNC-711 (0.5 mg/kg) y dizocilpina (0.1 mg/kg) en la prueba de automoldeamiento. La combinación de NNC-711 + dizocilpina evitó de manera significativa (9.4  $\pm$  2.4 % RC) el efecto amnésico de dizocilpina (0.62  $\pm$  0.62 % RC) en la MCP ( $p < 0.05$ ) (véase **Figura 19**).

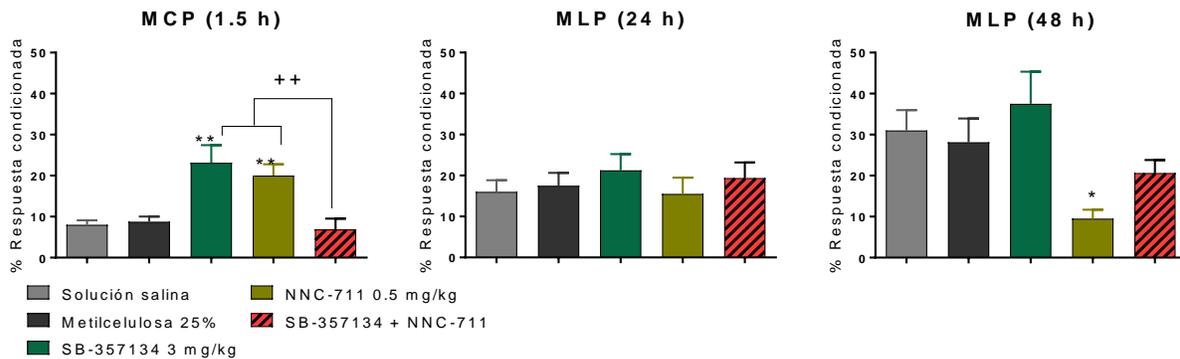


**Figura 19. Efecto de la inhibición de GAT1 en un modelo de amnesia inducido por dizocilpina en la prueba de automoldeamiento.** La combinación NNC-711 (0.5 mg/kg) + dizocilpina (0.1 mg/kg) evitó el efecto amnésico de dizocilpina en MCP. Los resultados representan la media  $\pm$  error estándar de % RC. ANOVA de una vía, *post hoc* Tukey; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  o  $p < 0.001$  vs solución salina; + $p < 0.05$  vs dizocilpina 0.1 mg/kg. n=8-10.

En contraste, en la MLP no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Estos resultados indican que la inhibición de GAT1 es efectiva para evitar el establecimiento de la amnesia por hipofunción glutamatérgica en la MCP.

### 7.9 Efecto de la inhibición de GAT1 sobre la respuesta de SB-357134 en la formación de la memoria

Resultados previos en este trabajo demostraron que SB-357134 en dosis de 3 mg/kg y NNC-711 en dosis de 0.5 mg/kg son dosis efectivas en la prueba de automoldeamiento. De acuerdo con lo anterior, para determinar si el aumento de la neurotransmisión GABAérgica modifica la respuesta del bloqueo del receptor 5-HT<sub>6</sub> en la formación de la memoria, se evaluó el efecto de la coadministración de SB-357134 y NNC-711 en dosis efectivas en la formación de la memoria. La combinación SB-357134 + NNC-711 ( $6.8 \pm 2.6$  % RC) disminuyó de manera significativa el % RC tanto de SB-357134 ( $23.57 \pm 4.9$  % RC;  $p < 0.01$ ) como de NNC-711 ( $20 \pm 2.78$  % RC;  $p < 0.01$ ) en MCP (véase **Figura 20**). Respecto a MLP, esta combinación no mostró efectos significativos, no obstante, a las 48 h la combinación SB-357134 + NNC-711 mostró un incremento ( $20.63 \pm 3.2$ ), aunque no de manera significativa en el % RC en comparación con el grupo tratado con NNC-711 ( $9.5 \pm 2.16$ ;  $p < 0.086$ ).



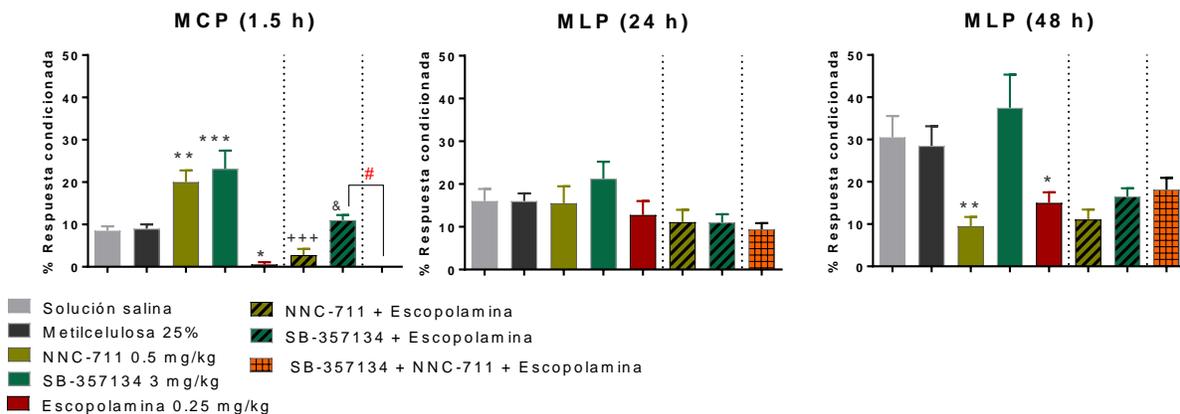
**Figura 20. Efecto de la combinación de SB-357134 + NNC-711 en la formación de la memoria.** La combinación SB-357134 (3 mg/kg) + NNC-711 (0.5 mg/kg) evitó de manera significativa los efectos facilitadores en MCP tanto de NNC-711 como de SB-357134. Los resultados representan la media  $\pm$  error estándar de % RC. ANOVA de una vía, *post hoc* Tukey; \* $p < 0.05$  o \*\* $p < 0.01$  vs vehículo correspondiente, ++ $p < 0.01$  vs SB-357134 (3 mg/kg) o NNC-711 (0.5 mg/kg). n=8-10.

Estos resultados sugieren que, la disminución de la neurotransmisión GABAérgica es necesaria para evocar el efecto pro-memoria del antagonismo del receptor 5-HT<sub>6</sub> en la MCP dado que el

aumento de la neurotransmisión GABAérgica (a través de la inhibición de GAT1) elimina el efecto facilitador de SB-357134.

### 7.10 Efecto de la inhibición de GAT1 sobre la respuesta de SB-357134 en un modelo de amnesia inducido por escopolamina

En experimentos previos se encontró que la inhibición de GAT1 evita el efecto promnésico de SB-357134. Para probar si la inhibición de GAT1 modifica el efecto anti-amnésico de SB-357134 en un modelo de amnesia inducido por escopolamina, se evaluó el efecto de la coadministración SB-357134 (3 mg/kg) + NNC-711 (0.5 mg/kg) + escopolamina (0.25 mg/kg) en la prueba de automoldeamiento. De manera interesante, el grupo tratado con SB-57134 + NNC-711 + escopolamina mostró una disminución significativa ( $0 \pm 0$ ) en el % RC con respecto al grupo tratado con SB-357134 (3 mg/kg) + escopolamina (0.25 mg/kg) ( $11 \pm 1.24$ ) en la MCP ( $p < 0.05$ ), pero no en MLP. No se observaron diferencias significativas entre el grupo con la triple administración con respecto a NNC-711 (0.5 mg/kg) + escopolamina (0.25 mg/kg) o con respecto a escopolamina (0.25 mg/kg) (véase **Figura 21**). En conjunto, estos hallazgos indican que el aumento de la neurotransmisión GABAérgica a través de la inhibición de GAT1 anula el efecto anti-amnésico del bloqueo del receptor 5-HT<sub>6</sub>.

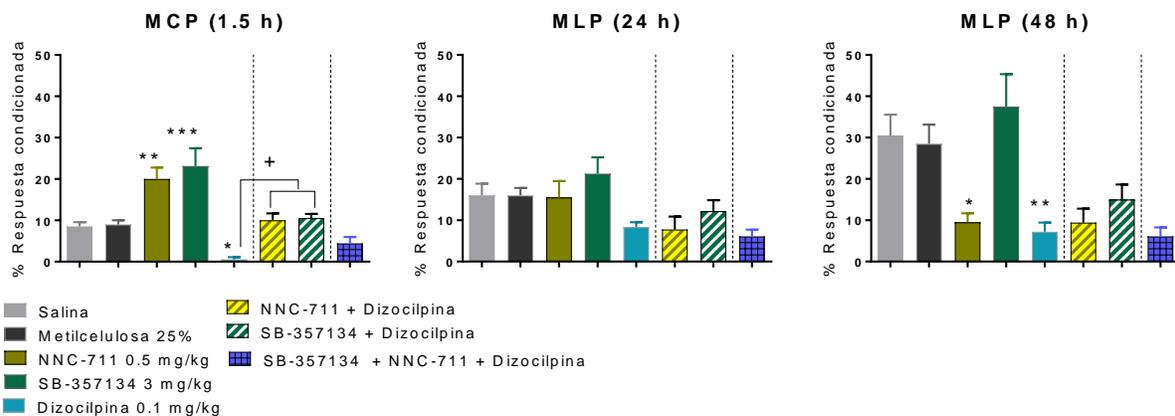


**Figura 21. Efecto de la combinación SB-357134 + NNC-711 + escopolamina en la prueba de automoldeamiento.** La combinación SB-357134 (3 mg/kg) + NNC-711 (0.5 mg/kg) + escopolamina (0.25 mg/kg) anuló el efecto anti-amnésico de SB-357134 (3 mg/kg) en la MCP. Los resultados representan la media  $\pm$  error estándar de % RC. ANOVA de una vía, *post hoc* Tukey; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  o \*\*\* $p < 0.001$  vs vehículo correspondiente, +++ $p < 0.001$  vs NNC-711 (0.5 mg/kg); & $p < 0.05$  vs escopolamina (0.25 mg/kg); # $p < 0.05$  vs SB-357134 (3 mg/kg) + escopolamina (0.25 mg/kg). n=8-10. Para una mejor comprensión de la gráfica, las

líneas discontinuas muestran la separación de tratamientos individuales, combinación de dos compuestos y combinación de tres compuestos.

### 7.11 Efecto de la inhibición de GAT1 sobre la respuesta de SB-357134 en un modelo de amnesia inducido por dizocilpina

Para probar si la inhibición de GAT1 modifica el efecto anti-amnésico de SB-357134 en un modelo de amnesia inducido por dizocilpina, se evaluó el efecto de la coadministración SB-357134 (3 mg/kg) + NNC-711 (0.5 mg/kg) + dizocilpina (0.1 mg/kg) en la prueba de automoldeamiento. La combinación de SB-357134 + NNC-711+ dizocilpina tanto en la MCP como en la MLP, no mostró diferencias significativas con respecto al grupo tratado con NNC-711 (0.5 mg/kg) + dizocilpina (0.25 mg/kg) o con respecto al grupo tratado con dizocilpina (0.1 mg/kg). Sin embargo, aunque no se encontraron diferencias significativas en el % RC entre el grupo tratado con la triple administración (SB-357134 + NNC-711 + dizocilpina) y el grupo tratado con SB-357134 (3 mg/kg) + dizocilpina (0.1 mg/kg), hubo una notable tendencia a disminuir el % RC en el grupo con la triple administración en comparación al grupo SB-357134 + dizocilpina tanto en MCP como en MLP (véase **Figura 22**). En conjunto, estos resultados indican que la inhibición de GAT1 disminuye parcialmente el efecto anti-amnésico del bloqueo del receptor 5-HT<sub>6</sub>, particularmente, en la MCP.



**Figura 22. Efecto de la combinación SB-357134 + NNC-711 + dizocilpina en la prueba de automoldeamiento.** La combinación SB-357134 (3 mg/kg) + NNC-711 (0.5 mg/kg) + dizocilpina (0.1 mg/kg) disminuyó, pero no significativamente, el efecto anti-amnésico de SB-357134 (3 mg/kg) en la MCP. Los resultados representan la media  $\pm$  error estándar de % RC. ANOVA de una vía, *post hoc* Tukey; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  o \*\*\* $p < 0.001$  vs vehículo correspondiente, + $p < 0.05$  vs dizocilpina (0.1 mg/kg).  $n = 8-10$ . Para una mejor comprensión de la gráfica, las líneas discontinuas muestran la separación de tratamientos individuales, combinación de dos compuestos y combinación de tres compuestos.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 El antagonismo del receptor 5-HT<sub>6</sub> facilita la MCP durante la formación de la memoria

En este trabajo se evaluó el efecto del antagonista del receptor 5-HT<sub>6</sub> SB-357134 a dosis de 0.5-3 mg/kg sobre la formación de la memoria. De manera interesante, se observó que el SB-357134 a la dosis de 3 mg/kg mejoró la memoria de corto plazo, pero no la MLP. Consistente con nuestro hallazgo, Meneses *et al.*, reportaron que la estimulación del receptor 5-HT<sub>6</sub> con EMD 386088 (5 mg/kg i.p.) deteriora la MCP y la MLP en una prueba de aprendizaje asociativo/instrumental (Meneses *et al.*, 2008). Así mismo, en un estudio reciente se demostró que EMD 386088 (2 mg/kg i.p.) en ratones C57BL/6J deteriora la memoria de trabajo espacial en la prueba de alternancia espontánea (Amodeo *et al.*, 2018), una prueba que evalúa memoria de corto plazo. Cabe mencionar que la activación del receptor 5-HT<sub>6</sub> con WAY 181187 disminuye la LTP hipocampal (West *et al.*, 2009). Por lo tanto, la activación del receptor 5-HT<sub>6</sub> parece deteriorar la memoria mientras que su bloqueo facilita la memoria.

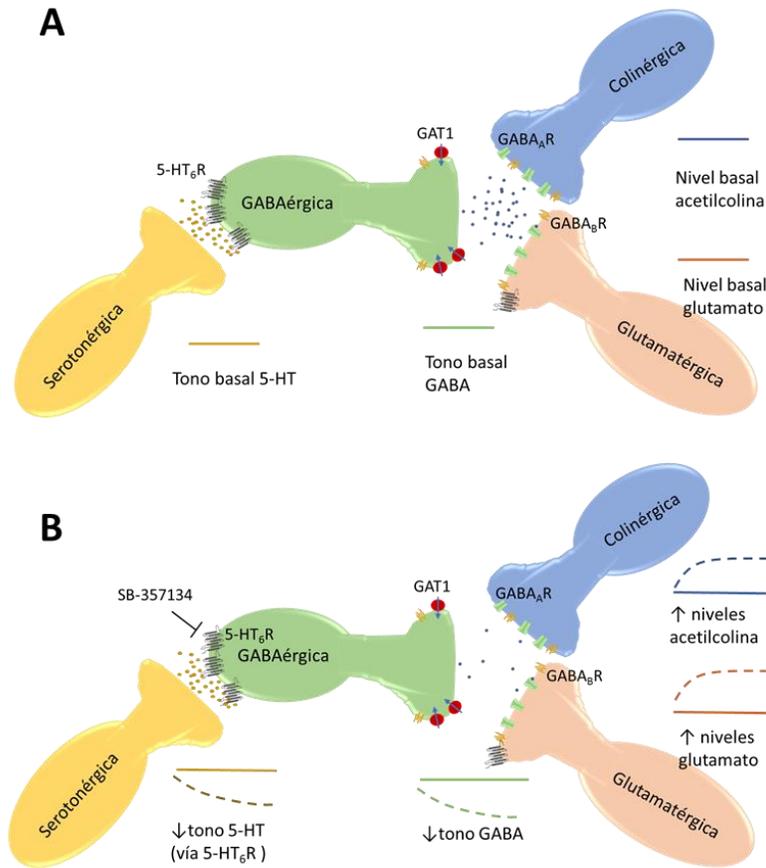
Anteriormente, Pérez-García y Meneses encontraron que a las dosis de 1-30 mg/kg SB-357134 mejoró la MLP en la prueba de automoldeamiento (Pérez-García y Meneses, 2005); en nuestro estudio no se encontraron efectos significativos de SB-357134 en MLP. Esta aparente discrepancia puede deberse a diferencias en protocolos y tipo de operando utilizados (indicador de estímulo condicionado). Pérez-García y Meneses emplearon un protocolo de consolidación y como operando palanca retráctil, mientras que en nuestro estudio se utilizó un protocolo de MCP y MLP (formación de memoria) y como operando el nose-poke. En este contexto, recientemente nuestro grupo de trabajo reportó que el operando nose-poke aumenta la tasa de respuestas en la prueba de automoldeamiento en comparación con el operando palanca retráctil (Aparicio-Nava *et al.*, 2018). Por lo tanto, es posible esperar diferencias cuando se comparan dosis farmacológicas de un tratamiento y se utilizan distintos operandos para medir memoria.

Por otra parte, a diferencia de la MLP, la MCP no requiere de síntesis de proteínas, pero sí de modificaciones postransduccionales como fosforilación de proteínas (Kandel, 2001; Kandel *et al.*, 2014). En modelos fisiológicos de plasticidad sináptica se ha documentado que durante la inducción de la LTP se requiere de fosforilación de receptores AMPA para aumentar la eficiencia

sináptica. Diversas proteínas intracelulares como la PKA, CaMKII y PKM $\zeta$ , (isoforma de PKC) son responsables de fosforilar a los receptores AMPA (Sweatt, 2010).

En este estudio, se demuestra que SB-357134 mejora la MCP, pero no la MLP. La cuestión en contexto es ¿cuál es el mecanismo molecular mediante el cual el antagonismo del receptor 5-HT $_6$  mejora la MCP? Para entender el posible mecanismo implicado hay que considerar la distribución espacial del receptor 5-HT $_6$ . Diversos estudios demuestran que el receptor 5-HT $_6$  se expresa en neuronas e interneuronas GABAérgicas (West *et al.*, 2009; Helboe *et al.*, 2015). Sin embargo, aunque se desconoce si hay modificaciones postraduccionales de proteínas en neuronas GABAérgicas durante la formación de la memoria, es probable que la disminución de la actividad de PKA por el bloqueo de los receptores 5-HT $_6$  en tales poblaciones neuronales, disminuya la actividad de los receptores AMPA por disminución de su fosforilación y como consecuencia se disminuya la respuesta excitatoria de las neuronas e interneuronas GABAérgicas. Así mismo, el bloqueo de los receptores 5-HT $_6$  disminuye la frecuencia de disparo por el aumento de corrientes de K $^+$  de los canales GIRK (Bonsi *et al.*, 2007). Colectivamente, la hiperpolarización de neuronas e interneuronas GABAérgicas permite la reducción del tono GABAérgico sobre neuronas colinérgicas y glutamatérgicas.

Por otra parte, durante la consolidación de la memoria en la prueba de automoldeamiento el mRNA del receptor 5-HT $_6$  tiende a disminuir en hipocampo, estriado y corteza prefrontal (Huerta-Rivas *et al.*, 2010). De manera similar, la formación de la memoria espacial se asocia a una disminución en la expresión del receptor 5-HT $_6$  en la región CA3 del hipocampo (Marcos *et al.*, 2010). Tales datos sugieren que una disminución en la actividad del receptor 5-HT $_6$  es necesaria para la formación de la memoria y, en efecto, nuestro estudio demuestra que el bloqueo del receptor 5-HT $_6$  facilita la memoria. Por lo tanto, sugerimos que en condiciones sin aprendizaje, los receptores 5-HT $_6$  de estructuras como hipocampo, corteza prefrontal y estriado reciben un tono serotoninérgico basal de los núcleos del rafe dorsal y medial, el cual mantiene activas a neuronas e interneuronas GABAérgicas (tono basal de GABA) que a su vez mantienen inhibidas a neuronas colinérgicas y glutamatérgicas (véase **Figura 23A**); esta idea se sustenta en parte por el conocimiento de que las proyecciones serotoninérgicas hacen sinapsis preferencialmente con células GABAérgicas (Freund, 1992).



**Figura 23. Mecanismo propuesto de participación del receptor 5-HT<sub>6</sub> en condiciones sin aprendizaje y en formación de memoria.** En A, en condiciones sin aprendizaje, los receptores 5-HT<sub>6</sub> localizados en neuronas e interneuronas GABAérgicas reciben un tono serotoninérgico de neuronas del núcleo del rafé dorsal y medial. La activación del receptor 5-HT<sub>6</sub> en estas neuronas promueve la liberación de GABA. La liberación tónica de GABA mantiene inhibidas a neuronas colinérgicas y glutamatérgicas a través de receptores GABA<sub>A</sub> (GABA<sub>A</sub>R) o GABA<sub>B</sub> (GABA<sub>B</sub>R). En B, bajo condiciones de formación de memoria, el bloqueo de los receptores 5-HT<sub>6</sub> (5-HT<sub>6</sub>R) disminuye el tono serotoninérgico sobre neuronas e interneuronas GABAérgicas y por tanto la liberación de GABA. La disminución de GABA promueve la desinhibición de neuronas colinérgicas y glutamatérgicas cuyos neurotransmisores facilitan la memoria. Las líneas sólidas representan los niveles basales de neurotransmisores en condiciones sin aprendizaje, las líneas discontinuas representan los niveles de neurotransmisores requeridos para la formación de la memoria. Las líneas por encima o debajo de la basal indican aumento o disminución de niveles de neurotransmisores, respectivamente.

En contraste, bajo condiciones de formación de la memoria, la administración de antagonistas del receptor 5-HT<sub>6</sub> disminuye el tono serotoninérgico vía receptor 5-HT<sub>6</sub> en neuronas GABAérgicas como ha sido sugerido anteriormente (King *et al.*, 2009), dando como resultado una reducción en el tono GABAérgico mediado por el aumento en las corrientes hiperpolarizantes de K<sup>+</sup> de canales GIRK y por la reducción de la actividad de canales de Ca<sup>2+</sup> (ej. Canales P/Q y L) (Wang y Sieburth,

2013). La reducción en el tono GABAérgico promueve la actividad de neuronas colinérgicas y glutamatérgicas cuyos neurotransmisores son responsables directamente de los efectos positivos sobre la memoria (Véase **Figura 23B**).

La cuestión de por qué SB-357134 mejoró la MCP pero no la MLP probablemente obedece a la intensidad del estímulo, es decir, bajo nuestras condiciones experimentales dosis mayores de SB-357134 probablemente mejoren la MLP como anteriormente ha sido reportado (Pérez-García y Meneses, 2005).

## **8.2 La inhibición de GAT1 afecta diferencialmente a la formación de la memoria**

Estudios genéticos y farmacológicos demuestran que el transportador GAT1 participa de manera importante en el aprendizaje y la memoria. En este trabajo evaluamos el efecto del inhibidor selectivo del transportador GAT1 NNC-711 (0.25, 0.5 y 1 mg/kg) ( $pIC_{50} = 7.2$ ) dado que en estudios previos la modulación negativa de GAT1 con este inhibidor demostró efectos significativos en distintos paradigmas de memoria. De manera interesante, en nuestro trabajo se observaron efectos bifásicos de NNC-711 de manera tiempo dependiente en la formación de la memoria. Estos hallazgos pueden deberse a distintos requerimientos temporales de GABA en la prueba de automoldeamiento. Por ejemplo, Tellez *et al.*, reportaron que durante la MLP (48 h) de esta prueba, el transportador GAT1 aumenta significativamente su expresión en CPF (Tellez *et al.*, 2012), lo cual sugiere que el aumento en la actividad de GAT1 es requerida para mantener bajos niveles de GABA extracelulares durante la MLP. En nuestro caso, se observó que bajas dosis del inhibidor de GAT1 mejora o no afecta la MCP, pero también deteriora la MLP lo cuál es consistente con la  $t_{=1/2}$  de NNC-711 (7-9 h) y el tiempo de inicio de formación de MLP en roedores (6 h post-entrenamiento) (Meneses, 2007).

Por otra parte, la reducción en la expresión de GAT1 en ratones dada por un genotipo heterocigoto de GAT1  $^{+/-}$ , resulta en una mejoría en la memoria espacial y en la memoria asociativa de tipo aversiva (Shi *et al.*, 2012). Consistente con tales hallazgos, O'Connell *et al.*, también observaron efectos facilitadores del inhibidor de GAT1 NNC-711 (0.5 y 1.5 mg/kg i.p.) en el paradigma del laberinto acuático de Morris. Sin embargo, NNC-711 a la dosis de 3 mg/kg deteriora la memoria asociativa en el paradigma de evitación pasiva (O'Connell *et al.*, 2001) y tiagabina a la dosis 10 mg/kg deteriora la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris

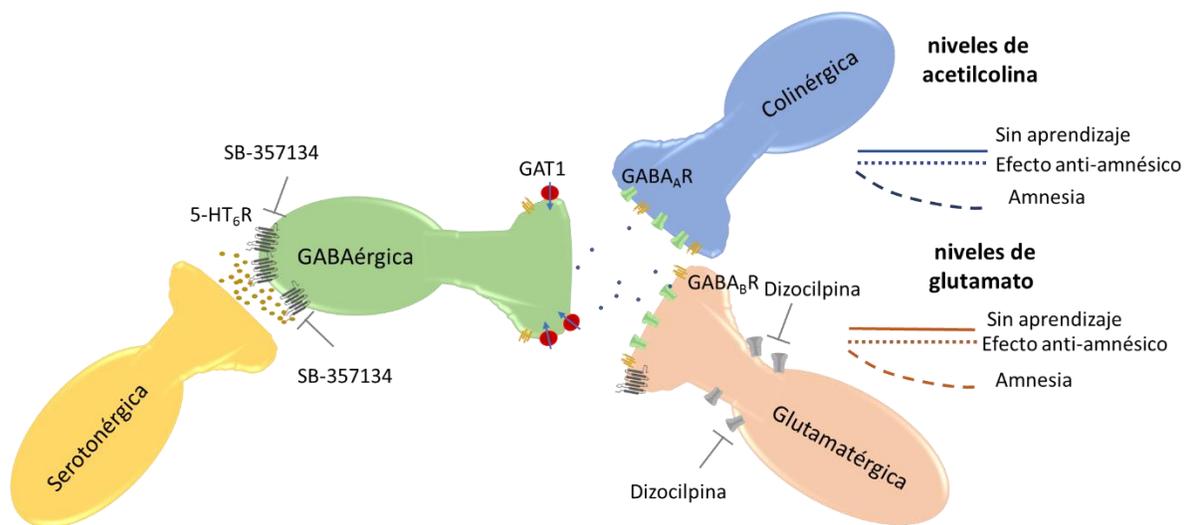
(Schmitt y Hiemke, 2002). Estos estudios son consistentes con la noción de que las memorias requieren de una fina inhibición sináptica para la regulación del disparo sincrónico de redes neuronales (Homayoun y Moghaddam, 2007).

En conjunto, nuestros hallazgos y el de otros autores sugieren que cierto aumento en los niveles de GABA a través de la inhibición de GAT1 favorece distintos tipos de memoria (ej. memoria asociativa y memoria espacial). No obstante, los requerimientos temporales de GABA parecen ser distintos entre paradigmas de memoria. Sin embargo, una cuestión que queda pendiente por resolver en estudios futuros será identificar qué receptores de GABA están implicados en mediar los efectos positivos de la inhibición de GAT1 sobre la memoria. Abordando brevemente esta idea, dado que la inhibición de GAT1 contribuye al aumento en los niveles de GABA extrasináptico o “ambiental” (Song *et al.*, 2013), un receptor de GABA candidato a explorar, es el receptor GABA<sub>A</sub> que contiene la subunidad  $\delta$  ya que en preparaciones fisiológicas mejora la LTP en hipocampo (Ruiz *et al.*, 2010).

### **8.3 El antagonismo del receptor 5-HT<sub>6</sub> evita el efecto amnésico inducido por escopolamina o dizocilpina**

Actualmente, un importante número de estudios demuestran que el antagonismo del receptor 5-HT<sub>6</sub> muestra efectos anti-mnésicos en diversos paradigmas de memoria incluyendo laberinto acuático de Morris (Marcos *et al.*, 2010), condicionamiento por miedo al contexto (Woods *et al.*, 2012), evitación pasiva (de Bruin *et al.*, 2016), reconocimiento de objetos nuevos (King *et al.*, 2009) y automoldeamiento (Meneses, 2001; Pérez-García y Meneses, 2005). Consistente con tales estudios, nosotros reportamos que el bloqueo del receptor 5-HT<sub>6</sub> con SB-357134 (3 mg/kg), evitó los efectos amnésicos inducidos por escopolamina o dizocilpina, lo cual sugiere que el efecto anti-amnésico de SB-357134 están mediados por una modulación positiva de la neurotransmisión colinérgica y glutamatérgica, respectivamente. Reforzando esta idea, en estudios de microdiálisis se ha reportado que el bloqueo del receptor 5-HT<sub>6</sub> con SB 271046 en ratas en libre movimiento, aumenta los niveles de acetilcolina en corteza frontal (Riemer Claus *et al.*, 2003) y también, aumenta los niveles de glutamato en corteza prefrontal medial e hipocampo dorsal (Dawson *et al.*, 2000; 2001).

De manera interesante, la cuestión en contexto que resalta a primera vista es ¿cómo el antagonismo del receptor 5-HT<sub>6</sub> puede evocar efectos anti-amnésicos en distintos modelos de amnesia? Una posible respuesta es que bajo cada condición de amnesia se reclutan diferentes circuitos neuronales. Por ejemplo, en el caso de escopolamina, la amnesia es el resultado de una hipofunción colinérgica global (Ebert y Kirch, 1998). Por lo tanto, el posible circuito neuronal reclutado por el bloqueo del receptor 5-HT<sub>6</sub> que restablece en cierto grado la actividad colinérgica implica el aumento en la actividad de neuronas colinérgicas a través de neuronas o interneuronas GABAérgicas que expresan al receptor 5-HT<sub>6</sub> (véase **Figura 24**).



**Figura 24. Representación gráfica de los efectos anti-amnésicos evocados por el antagonismo del receptor 5-HT<sub>6</sub>.** En la amnesia inducida por hipofunción glutamatérgica, dizocilpina bloquea receptores NMDA localizados principalmente en neuronas glutamatérgicas generando una disminución en la actividad glutamatérgica, el antagonismo de los receptores 5-HT<sub>6</sub> con SB-357134 disminuye la liberación de GABA y como consecuencia se desinhiben neuronas glutamatérgicas promoviendo la liberación de glutamato. En la amnesia inducida por escopolamina el efecto global es una hipofunción colinérgica, la escopolamina actúa sobre receptores muscarínicos (no mostrado en ilustración por cuestión de simplicidad) localizados mayormente en neuronas glutamatérgicas, interfiriendo con la señalización colinérgica. El antagonismo del receptor 5-HT<sub>6</sub> promueve la liberación de acetilcolina por disminución de la actividad GABAérgica, este incremento en acetilcolina restablece la función colinérgica alterada. Las líneas sólidas representan niveles de neurotransmisores en condiciones sin aprendizaje. Las líneas discontinuas representan los niveles de neurotransmisores en condiciones de amnesia. Las líneas punteadas representan los niveles de neurotransmisores resultantes del antagonismo del receptor 5-HT<sub>6</sub>.

Esta noción es consistente con la distribución poblacional del receptor 5-HT<sub>6</sub> demostrada en neuronas e interneuronas GABAérgicas de hipocampo y corteza prefrontal (West *et al.*, 2009; Helboe *et al.*, 2015) y su ausencia en neuronas colinérgicas de estructuras corticales y de hipocampo (Marcos *et al.*, 2006; Helboe *et al.*, 2015). Un proceso similar puede estar ocurriendo en un modelo de amnesia por hipofunción glutamatérgica, solo que, aunque en este caso es probable que haya una modulación positiva de neuronas glutamatérgicas por el bloqueo de los receptores 5-HT<sub>6</sub> en neuronas o interneuronas GABAérgicas (véase **Figura 24**).

En conjunto, nuestros hallazgos corroboran el efecto anti-amnésico evocado por el bloqueo del receptor 5-HT<sub>6</sub> y también demuestran que bajo nuestras condiciones experimentales hay una interacción temporal, particularmente en la MCP, entre el sistema serotoninérgico (vía receptor 5-HT<sub>6</sub>) y sistema colinérgico o glutamatérgico en la prueba de automoldeamiento.

#### **8.4 La inhibición de GAT1 evita el efecto amnésico inducido por dizocilpina, pero no por escopolamina**

La combinación de NNC-711 (0.5 mg/kg) + escopolamina (0.25 mg/kg) o dizocilpina (0.1 mg/kg) mostró efectos diferenciales en la formación de la memoria. NNC-711 no evitó y tampoco exacerbó los efectos amnésicos de escopolamina. Consistente con este hallazgo, Salat *et al.*, reportaron que la inhibición de GAT1 con tiagabina (10 mg/kg i.p.) no exacerbó el deterioro de la adquisición de la memoria espacial inducido por escopolamina en el laberinto acuático de Morris (Salat *et al.*, 2015). Notablemente, en nuestro estudio la combinación NNC-711 + escopolamina evitó el efecto facilitador de NNC-711 (0.5 mg/kg) en la MCP lo cual sugiere que el efecto promnésico de NNC-711 es sensible al bloqueo de receptores muscarínicos.

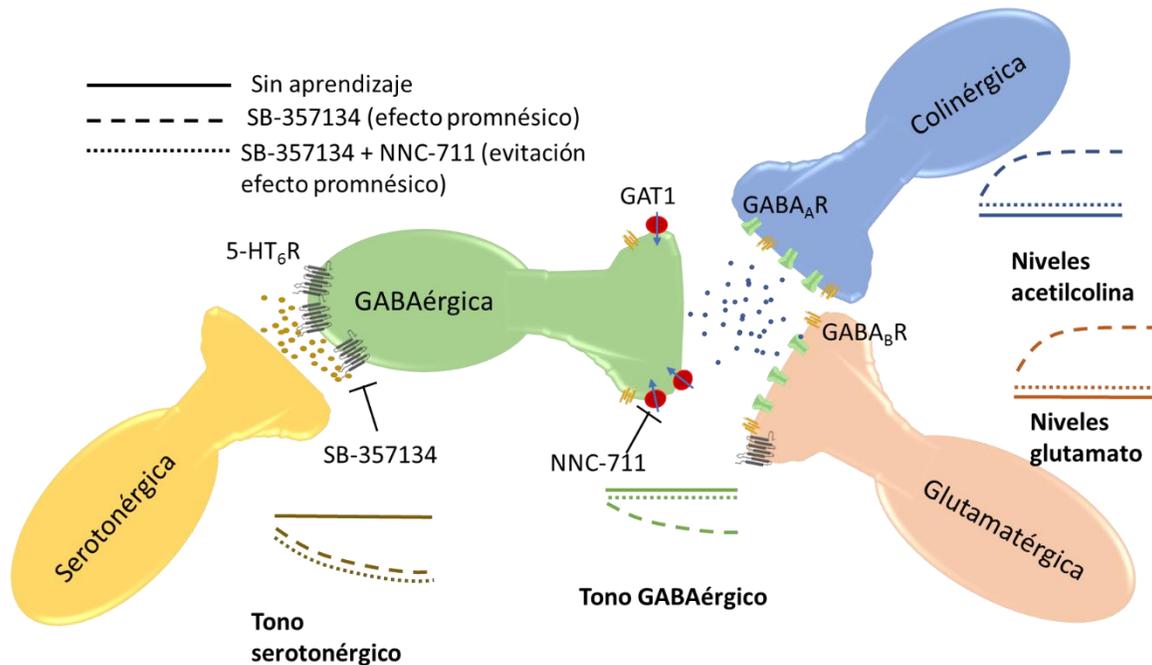
Por otra parte, NNC-711 (0.5 mg/kg) evitó el efecto amnésico inducido por dizocilpina en la MCP. De acuerdo con este hallazgo, en modelos animales, antagonistas del receptor NMDA (ej. dizocilpina, fenciclidina y ketamina) simulan de manera similar los déficits de memoria de trabajo (un tipo de MCP) observados en pacientes con esquizofrenia (Gunduz-Bruce, 2009). Tales déficits en la memoria de trabajo han sido asociados a una disminución en la neurotransmisión GABAérgica en corteza prefrontal dorsolateral (Lewis *et al.*, 2004). Consistente con lo anterior, se ha reportado que los receptores NMDA, además de expresarse en neuronas glutamatérgicas,

también se encuentran expresados en neuronas GABAérgicas (Lisman *et al.*, 2008) y por tanto, el bloqueo de los receptores NMDA genera una disminución de la actividad GABAérgica. Curiosamente, esta disminución de la actividad GABAérgica promueve una hiperactividad en las neuronas piramidales (glutamatérgicas); no obstante, este mecanismo únicamente parece restringirse a estructuras corticales como se demuestra en humanos y roedores (Homayoun y Moghaddam, 2007). Por lo tanto, es probable que la inhibición de GAT1 aumente los niveles endógenos de GABA restableciendo en cierto grado la neurotransmisión GABAérgica alterada en la amnesia inducida por dizocilpina. Además, sugerimos que el sitio de acción de NNC-711 para evocar tal efecto anti-amnésico es la corteza prefrontal dorsolateral cuya estructura homóloga en roedores es la corteza prefrontal medial.

### **8.5 La inhibición de GAT1 evita el efecto promnésico inducido por el antagonismo del receptor 5-HT<sub>6</sub> en la formación de la memoria**

Estudios preclínicos previos sugieren que el antagonismo del receptor 5-HT<sub>6</sub> mejora la memoria en diversos paradigmas de memoria (Meneses, 2001; Pérez-García y Meneses, 2005; King *et al.*, 2009) y en conjunto con estudios de microdiálisis, se sugiere una participación de la neurotransmisión GABAérgica (Schechter *et al.*, 2008) en mediar tales efectos promnésicos (West *et al.*, 2009; Codony *et al.*, 2011; Woods *et al.*, 2012). Sin embargo, se desconoce si los hallazgos encontrados en estudios de microdiálisis (sin condición de aprendizaje) explican consistentemente los efectos promnésicos de antagonistas del receptor 5-HT<sub>6</sub> en la memoria como fenómeno conductual. Para probar la hipótesis de que tales efectos promnésicos se deben principalmente a una disminución de la neurotransmisión GABAérgica, utilizamos la estrategia experimental de inhibir al transportador GAT1 para aumentar los niveles endógenos de GABA en conjunto con el bloqueo del receptor 5-HT<sub>6</sub>. Por lo tanto, se evaluó el efecto de la interacción de NNC-711 (0.5 mg/kg) y SB-35713 (3 mg/kg) en el paradigma de automoldeamiento. De manera interesante, esta combinación evita los efectos promnésicos de SB-357134 en la MCP, lo cual sustenta la idea de que una disminución de la neurotransmisión GABAérgica es necesaria para evocar los efectos promnésicos de antagonistas del receptor 5-HT<sub>6</sub> (véase **Figura 25**), y particularmente en nuestro estudio, en la MCP. Además, es importante mencionar que la dosis seleccionada de NNC-711 (0.5 mg/kg) en este estudio, también ha demostrado ser una dosis efectiva en rangos similares en otros paradigmas de memoria como evitación pasiva (0.25-3 mg/kg) y laberinto acuático de Morris (0.5-

1.5 mg/kg) (O'Connell *et al.*, 2001) y en varios modelos de epilepsia (0.23-3 mg/kg) (Suzdak *et al.*, 1992). Por lo tanto, los efectos observados de NNC-711 (0.5 mg/kg) en nuestro estudio son debidos al aumento en los niveles de GABA extracelulares por la inhibición del transportador GAT1.



**Figura 25. Representación gráfica del efecto de la inhibición de GAT1 sobre el efecto promnésico inducido por el antagonismo del receptor 5-HT<sub>6</sub>.** El antagonismo de los receptores 5-HT<sub>6</sub> (SB-357134) de neuronas e interneuronas GABAérgicas disminuye el tono serotónico vía este receptor, como consecuencia también hay una disminución del tono GABAérgico que reciben neuronas colinérgicas y glutamatérgicas. Esta disminución en el tono GABAérgico promueve un incremento en los niveles de acetilcolina y de glutamato. En contraste, cuando se inhibe al transportador GAT1 (NNC-711) y se bloquea al receptor 5-HT<sub>6</sub> (SB-357134) de manera simultánea, el tono GABAérgico aumenta nuevamente a cierto nivel que permite inhibir a neuronas colinérgicas y glutamatérgicas dando como resultado la disminución en los niveles de acetilcolina y glutamato y, por tanto, la desaparición del efecto promnésico de SB-357134. Las líneas sólidas representan niveles basales de neurotransmisores, las líneas discontinuas o punteadas por encima de la basal indican un aumento y por debajo de la basal indican una disminución.

Por otra parte, nuestro hallazgo es consistente con la distribución del receptor 5-HT<sub>6</sub> en neuronas e interneuronas GABAérgicas (Woolley *et al.*, 2004; Helboe *et al.*, 2015) y con estudios de microdiálisis donde se ha reportado que la estimulación del receptor 5-HT<sub>6</sub> con WAY 181187 aumenta los niveles extracelulares de GABA y tal efecto es revertido con el co-tratamiento del

antagonista SB-271046 (Schechter *et al.*, 2008). Curiosamente, también se ha reportado que el receptor 5-HT<sub>6</sub> se localiza en ciertas neuronas piramidales de hipocampo y corteza frontal (Helboe *et al.*, 2015) y se esperaría que el bloqueo de los receptores 5-HT<sub>6</sub> en esta población neuronal deteriorara la memoria por una disminución de la neurotransmisión glutamatérgica. Sin embargo, tal efecto no fue observado en nuestro estudio. Esta aparente discrepancia se puede atribuir al menos a dos posibilidades. La primera posibilidad implica la función de interneuronas GABAérgicas dado que se sabe que estas células ejercen un control espaciotemporal preciso y altamente específico de neuronas piramidales (neuronas glutamatérgicas) en circuitos locales (Tremblay *et al.*, 2016), por tanto, aunque células piramidales expresen al receptor 5-HT<sub>6</sub>, el efecto global del antagonismo del receptor 5-HT<sub>6</sub> es un efecto promnésico consecuente de la disminución en la neurotransmisión GABAérgica. La segunda posibilidad implica que los receptores 5-HT<sub>6</sub> se encuentren acoplados a mecanismos transduccionales distintos al mecanismo canónico G $\alpha$ s. Particularmente, un estudio relativamente reciente sugiere que en neuronas glutamatérgicas de la región CA3, los receptores 5-HT<sub>6</sub> están acoplados a proteínas G $\alpha$ i (Wang *et al.*, 2016), por lo tanto, se esperaría que el bloqueo de estos receptores en neuronas glutamatérgicas promueva la activación de la vía PKA y sus mecanismos asociados a la memoria (ej. fosforilación de canales AMPA en el caso de MCP).

Por otra parte, en estudios electrofisiológicos la estimulación del receptor 5-HT<sub>6</sub> con ST 1936 o WAY 181187 disminuyen la frecuencia de las corrientes postsinápticas excitatorias (EPSCs) tanto en rebanadas estriales como corticales sugiriendo que la activación de los receptores 5-HT<sub>6</sub> inhibe la neurotransmisión glutamatérgica (Tassone *et al.*, 2011). De manera similar, la estimulación del receptor 5-HT<sub>6</sub> de la región CA1 de hipocampo aumenta la frecuencia de las corrientes postsinápticas inhibitorias (IPSCs), lo cual indica que la activación de este receptor promueve la neurotransmisión GABAérgica (West *et al.*, 2009). En general, estos datos refuerzan nuestra idea sobre una interacción del receptor 5-HT<sub>6</sub> y el sistema GABAérgico para modular la memoria.

En resumen, nuestro trabajo demuestra por primera vez mediante la combinación de experimentos farmacológicos y conductuales que la disminución de la actividad GABAérgica es necesaria para evocar los efectos promnésicos del bloqueo del receptor 5-HT<sub>6</sub> durante la formación de memoria.

## 8.6 La inhibición de GAT1 interfiere con los efectos anti-amnésicos del bloqueo del receptor 5-HT<sub>6</sub> en la prueba de automoldeamiento

El potencial terapéutico de antagonistas del receptor 5-HT<sub>6</sub> para tratar los déficits de memoria ha sido ampliamente demostrado en estudios preclínicos; sin embargo, el mecanismo neuroquímico implicado es escasamente conocido. Conocer el mecanismo neuroquímico implicado es de gran relevancia dentro del ámbito de la terapéutica dado que varios antagonistas del receptor 5-HT<sub>6</sub> han sido evaluados (principalmente como coadyuvantes de inhibidores de la acetilcolinesterasa) en ensayos clínicos para tratar déficits cognitivos observados en la enfermedad de Alzheimer (Ferrero *et al.*, 2017). Sin embargo, los ensayos clínicos de fase III han fallado en encontrar eficacia alguna en pacientes con enfermedad de Alzheimer de leve a moderado (Khoury *et al.*, 2018).

En este estudio evidenciamos de manera convincente que una disminución de la actividad GABAérgica es necesaria para evocar el efecto promnésico de antagonistas del receptor 5-HT<sub>6</sub>. Con esta noción en contexto, también encontramos que, en la MCP, la inhibición de GAT1 evitó dramáticamente el efecto anti-amnésico de SB-357134 en el modelo de amnesia inducido por escopolamina. De manera similar, la inhibición de GAT1 mostró una clara tendencia a disminuir el efecto anti-amnésico de SB-357134 en el modelo de amnesia inducido por dizocilpina. Estos hallazgos, refuerzan la idea de que la disminución de GABA es responsable de evocar los efectos anti-amnésicos de antagonistas del receptor 5-HT<sub>6</sub>. En contraste, en un estudio reciente, Helboe *et al.*, a partir de estudios de doble hibridación *in situ*, sugieren que el receptor 5-HT<sub>6</sub> al expresarse en neuronas e interneuronas GABAérgicas y neuronas glutamatérgicas regulan el balance excitación e inhibición (Helboe *et al.*, 2015). Sin embargo, los estudios de microdiálisis *in vivo* (Dawson *et al.*, 2000a; 2001; Claus Riemer *et al.*, 2003; Schechter *et al.*, 2008), electrofisiológicos (Marcos *et al.*, 2006; West *et al.*, 2009; Tassone *et al.*, 2011) y nuestro estudio, claramente sugieren una fuerte relación entre receptor 5-HT<sub>6</sub> y la neurotransmisión GABAérgica. Por lo tanto, sugerimos que bajo condiciones de amnesia, el efecto global del antagonismo del receptor 5-HT<sub>6</sub> también requiere de una reducción de la neurotransmisión GABAérgica para evocar los efectos anti-amnésicos de antagonistas del receptor 5-HT<sub>6</sub>. Así mismo, nuestros hallazgos destacan la función de las neuronas e interneuronas GABAérgicas en mediar tales efectos.

En general, en este estudio hemos presentado evidencia consistente que elucida la participación de la neurotransmisión GABAérgica como mecanismo neuroquímico relevante para evocar efectos promnésicos y anti-amnésicos evocados por el antagonismo del receptor 5-HT<sub>6</sub>.

Estudios futuros deberán elucidar la participación de las vías de señalización del receptor 5-HT<sub>6</sub> (ej. vía Jab1, ERK1/2, Rho-A) sobre la memoria en distintas condiciones para entender las consecuencias que representa el antagonismo del receptor 5-HT<sub>6</sub> como estrategia terapéutica para los déficits de memoria.

## **9. CONCLUSIONES PARTICULARES**

El antagonismo del receptor 5-HT<sub>6</sub> con SB-357134 mejora la memoria y muestra efectos anti-amnésicos.

La inhibición de GAT1 con NNC-711 afecta diferencialmente a la formación de la memoria de manera tiempo dependiente; facilita la MCP, pero deteriora la MLP, por lo tanto, niveles diferenciales de GABA son requeridos durante la formación de la memoria. En condiciones de deterioro de MCP como el caso de la esquizofrenia, la inhibición de GAT1 puede ser una estrategia terapéutica para los déficits de memoria.

El efecto promnésico del antagonismo del receptor 5-HT<sub>6</sub> está mediado por una disminución de la neurotransmisión GABAérgica. De manera similar, los efectos anti-amnésicos del bloqueo del receptor 5-HT<sub>6</sub> están mediados por una disminución de la neurotransmisión GABAérgica.

## **10. CONCLUSIÓN GENERAL**

Los efectos promnésicos y anti-amnésicos de antagonistas del receptor 5-HT<sub>6</sub> están mediados por una disminución de la neurotransmisión GABAérgica.

## **11. PERSPECTIVAS**

- Determinar si la corteza prefrontal medial es el sitio de acción de NNC-711 para mostrar efectos anti-amnésicos.
- Evaluar la combinación SB-357134 + NNC-711 en hipocampo, corteza prefrontal y estriado en la formación de memoria.
- Determinar si el antagonismo del receptor 5-HT<sub>6</sub> modifica la expresión de proteínas como Jab1, ERK1/2, la cinasa Fyn, y Rho-A en la formación de la memoria.

## 12. REFERENCIAS

- Amodeo, D. A., Peterson, S., Pahua, A., Posadas, R., Hernandez, A., Hefner, E., Qi, D. y Vega, J. (2018) '5-HT<sub>6</sub> receptor agonist EMD386088 impairs behavioral flexibility and working memory', *Behavioural Brain Research*. 349, pp. 8–15. doi: 10.1016/J.BBR.2018.04.032.
- Aparicio-Nava, L., Márquez-García, L. A. y Meneses, A. (2018) 'Effects of 5-HT<sub>5A</sub> receptor blockade on amnesia or forgetting', *Behavioural Brain Research*. doi: 10.1016/J.BBR.2018.01.009.
- Arts, N. J., Walvoort, S. J. y Kessels, R. P. (2017) 'Korsakoff's syndrome: a critical review.', *Neuropsychiatric disease and treatment*. pp. 2875–2890. doi: 10.2147/NDT.S130078.
- Bajo, R., Pusil, S., López, M. E., Canuet, L., Pereda, E., Osipova, D., Maestú, F. y Pekkonen, E. (2015) 'Scopolamine effects on functional brain connectivity: a pharmacological model of Alzheimer's disease', *Scientific Reports*, 5(1), p. 9748. doi: 10.1038/srep09748.
- Ballinger, E. C., Ananth, M., Talmage, D. A. y Role, L. W. (2016) 'Basal Forebrain Cholinergic Circuits and Signaling in Cognition and Cognitive Decline', *Neuron*. 91(6), pp. 1199–1218. doi: 10.1016/j.neuron.2016.09.006.
- Barco, A., Bailey, C. H. and Kandel, E. R. (2006) 'Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory', *Journal of Neurochemistry*. 97(6), pp. 1520–1533. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03870.x.
- Berridge, M. J. (2014) *Cell Signalling Biology*, *Cell Signalling Biology*. Portland Press Journals portal. doi: 10.1042/csb0001002.
- Bianchi, M. y Panerai, A. E. (1993) 'Reversal of scopolamine-induced amnesia by the GABAB receptor antagonist CGP 35348 in the mouse', *Cognitive Brain Research*. 1(2), pp. 135–136. doi: 10.1016/0926-6410(93)90018-Z.
- Bliss, T. V. P. y Lømo, T. (1973) 'Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path', *The Journal of Physiology*. 232(2), pp. 331–356. doi: 10.1113/jphysiol.1973.sp010273.
- Blokland, A., Sambeth, A., Prickaerts, J. y Riedel, W. J. (2016) 'Why an M1 Antagonist Could Be a More Selective Model for Memory Impairment than Scopolamine.', *Frontiers in neurology*. 7, p. 167. doi: 10.3389/fneur.2016.00167.

Bonsi, P., Cuomo, D., Ding, J., Sciamanna, G., Ulrich, S., Tschertter, A., Bernardi, G., Surmeier, D. J. y Pisani, A. (2007) 'Endogenous serotonin excites striatal cholinergic interneurons via the activation of 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>6</sub>, and 5-HT<sub>7</sub> serotonin receptors: Implications for extrapyramidal side effects of serotonin reuptake inhibitors', *Neuropsychopharmacology*. 32(8), pp. 1840–1854. doi: 10.1038/sj.npp.1301294.

Brady, S. T., Siegel, G. J., Albers, R. W. (Robert W. y Price, D. L. (Donald L. (2012) *Basic neurochemistry : principles of molecular, cellular, and medical neurobiology*. Eighth Edition. Academy Press.

Brioni, J. D. (1993) 'Role of GABA during the multiple consolidation of memory', *Drug Development Research*. 28(1), pp. 3–27. doi: 10.1002/ddr.430280103.

Bromidge, S. M., Clarke, S. E., Gager, T., Griffith, K., Jeffrey, P., Jennings, A. J., Joiner, G. F., King, F. D., Lovell, P. J., Moss, S. F., Newman, H., Riley, G., Rogers, D., Routledge, C., Serafinowska, H. y Smith, D. R. (2001) 'Phenyl benzenesulfonamides are novel and selective 5-HT<sub>6</sub> antagonists: Identification of N-(2,5-dibromo-3-fluorophenyl)-4-methoxy-3-piperazin-1-ylbenzenesulfonamide (SB-357134)', *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 11(1), pp. 55–58. doi: 10.1016/S0960-894X(00)00597-7.

de Bruin, N. M. W. J., van Loevezijn, A., Wicke, K. M., de Haan, M., Venhorst, J., Lange, J. H. M., de Groote, L., van der Neut, M. A. W., Prickaerts, J., Andriambelison, E., Foley, A. G., van Drimmelen, M., van der Wetering, M. y Kruse, C. G. (2016) 'The selective 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist SLV has putative cognitive- and social interaction enhancing properties in rodent models of cognitive impairment', *Neurobiology of Learning and Memory*. 133, pp. 100–117. doi: 10.1016/j.nlm.2016.06.020.

Burke, D. A., Rotstein, H. G. y Alvarez, V. A. (2017) 'Striatal Local Circuitry: A New Framework for Lateral Inhibition', *Neuron*. 96(2), pp. 267–284. doi: 10.1016/J.NEURON.2017.09.019.

Carnevale, D., Perrotta, M., Lembo, G. y Trimarco, B. (2016) 'Pathophysiological Links Among Hypertension and Alzheimer's Disease', *High Blood Pressure and Cardiovascular Prevention*, 23(1), pp. 3–7. doi: 10.1007/s40292-015-0108-1.

Castellano, C., Brioni, J. D., Nagahara, A. H. y McGaugh, J. L. (1989) 'Post-training systemic and intra-amygdala administration of the GABA-B agonist baclofen impairs retention', *Behavioral and Neural Biology*. 52(2), pp. 170–179. doi: 10.1016/S0163-1047(89)90285-9.

Choi, Y. H., Kang, H., Lee, W. K., Kim, T., Rhim, H. y Yu, Y. G. (2007) 'An inhibitory compound

against the interaction between  $G\alpha_s$  and the third intracellular loop region of serotonin receptor subtype 6 (5-HT<sub>6</sub>) disrupts the signaling pathway of 5-HT<sub>6</sub>, *Experimental and molecular medicine*, 39(3), pp. 335–342. doi: 10.1038/emm.2007.37.

Codony, X., Vela, J. M. y Ramírez, M. J. (2011) '5-HT<sub>6</sub> receptor and cognition', *Current Opinion in Pharmacology*. 11(1), pp. 94–100. doi: 10.1016/j.coph.2011.01.004.

Dawson, L. A., Nguyen, H. Q. y Li, P. (2000) 'In vivo effects of the 5-HT<sub>6</sub> antagonist SB-271046 on striatal and frontal cortex extracellular concentrations of noradrenaline, dopamine, 5-HT, glutamate and aspartate', *British Journal of Pharmacology*. 130(1), pp. 23–26. doi: 10.1038/sj.bjp.0703288.

Dawson, L. A., Nguyen, H. Q. y Li, P. (2001) 'The 5-HT<sub>6</sub> Receptor Antagonist SB-271046 Selectively Enhances Excitatory Neurotransmission in the Rat Frontal Cortex and Hippocampus', *Neuropsychopharmacology*. 25(25), pp. 662–668.

Deraredj Nadim, W., Chaumont-Dubel, S., Madouri, F., Cobret, L., De Tausia, M.-L., Zajdel, P., Bénédicti, H., Marin, P. y Morisset-Lopez, S. (2016) 'Physical interaction between neurofibromin and serotonin 5-HT<sub>6</sub> receptor promotes receptor constitutive activity.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 113(43), pp. 12310–12315. doi: 10.1073/pnas.1600914113.

Ebert y Kirch (1998) 'Scopolamine model of dementia: electroencephalogram findings and cognitive performance', *European Journal of Clinical Investigation*. 28(11), pp. 944–949. doi: 10.1046/j.1365-2362.1998.00393.x.

Fagerholm, E. D., Hellyer, P. J., Scott, G., Leech, R. y Sharp, D. J. (2015) 'Disconnection of network hubs and cognitive impairment after traumatic brain injury.', *Brain : a journal of neurology*. 138(Pt 6), pp. 1696–709. doi: 10.1093/brain/awv075.

Farrant, M. y Nusser, Z. (2005) 'Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABAA receptors', *Nature Reviews Neuroscience*. 6(3), pp. 215–229. doi: 10.1038/nrn1625.

Fernandez, S. P., Muzerelle, A., Scotto-Lomassese, S., Barik, J., Gruart, A., Delgado-García, J. M. y Gaspar, P. (2017) 'Constitutive and Acquired Serotonin Deficiency Alters Memory and Hippocampal Synaptic Plasticity', *Neuropsychopharmacology*. 42(2), pp. 512–523. doi: 10.1038/npp.2016.134.

Ferrero, H., Solas, M., Francis, P. y Ramirez, M. (2017) 'Serotonin 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonists in Alzheimer's disease: Therapeutic rationale and current development status', *CNS drugs*, 31(1), pp. 19–32.

- Filip, M. y Bader, M. (2009) 'Overview on 5-HT receptors and their role in physiology and pathology of the central nervous system', *Pharmacological Reports*, (61), pp. 761–77.
- Freund, T. F. (1992) 'GABAergic septal and serotonergic median raphe afferents preferentially innervate inhibitory interneurons in the hippocampus and dentate gyrus.', *Epilepsy research. Supplement*, 7, pp. 79–91.
- Gérard, C., Mestikawy, S. El, Lebrand, C., Adrien, J., Ruat, M., Traiffort, E., Hamon, M. y Martres, M.-P. (1996) 'Quantitative RT-PCR distribution of serotonin 5-HT<sub>6</sub> receptor mRNA in the central nervous system of control or 5,7-dihydroxytryptamine-treated rats', *Synapse*. 23(3), pp. 164–173. doi: 10.1002/(SICI)1098-2396(199607)23:3<164::AID-SYN5>3.0.CO;2-6.
- Ghoneim, M. M. y Mewaldt, S. P. (1977) 'Studies on human memory: The interactions of diazepam, scopolamine, and physostigmine', *Psychopharmacology*. Springer-Verlag, 52(1), pp. 1–6. doi: 10.1007/BF00426592.
- Gong, N., Li, Y., Cai, G.-Q., Niu, R.-F., Fang, Q., Wu, K., Chen, Z., Lin, L.-N., Xu, L., Fei, J. y Xu, T.-L. (2009) 'GABA Transporter-1 Activity Modulates Hippocampal Theta Oscillation and Theta Burst Stimulation-Induced Long-Term Potentiation', *Journal of Neuroscience*, 29(50).
- Gonzalez-Burgos, G. (2010) 'GABA Transporter GAT1: A Crucial Determinant of GABAB Receptor Activation in Cortical Circuits?', in, pp. 175–204. doi: 10.1016/S1054-3589(10)58008-6.
- Gunduz-Bruce, H. (2009) 'The acute effects of NMDA antagonism: From the rodent to the human brain', *Brain Research Reviews*. 60(2), pp. 279–286. doi: 10.1016/J.BRAINRESREV.2008.07.006.
- Hannon, J. y Hoyer, D. (2008) 'Molecular biology of 5-HT receptors', *Behavioural Brain Research*. 195(1), pp. 198–213. doi: 10.1016/J.BBR.2008.03.020.
- Hasselmo, M. E. (2006) 'The role of acetylcholine in learning and memory', *Current Opinion in Neurobiology*. 16(6), pp. 710–715. doi: 10.1016/J.CONB.2006.09.002.
- Helboe, L., Egebjerg, J. y de Jong, I. E. M. (2015) 'Distribution of serotonin receptor 5-HT<sub>6</sub> mRNA in rat neuronal subpopulations: A double in situ hybridization study', *Neuroscience*. 310, pp. 442–454. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.09.064.
- Hell, J. W., Yokoyama, C. T., Breeze, L. J., Chavkin, C. y Catterall, W. A. (1995) 'Phosphorylation of presynaptic and postsynaptic calcium channels by cAMP-dependent protein kinase in hippocampal

neurons', *The EMBO Journal*, 14(13), pp. 3036–3044.

Hirst, W. D., Abrahamsen, B., Blaney, F. E., Calver, A. R., Aloj, L., Price, G. W. y Medhurst, A. D. (2003) 'Differences in the Central Nervous System Distribution and Pharmacology of the Mouse 5-Hydroxytryptamine-6 Receptor Compared with Rat and Human Receptors Investigated by Radioligand Binding, Site-Directed Mutagenesis, and Molecular Modeling', *Molecular Pharmacology*, 64(6).

Homayoun, H. y Moghaddam, B. (2007) 'NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons.', *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 27(43), pp. 11496–500. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2213-07.2007.

Hu, J.-H., Ma, Y.-H., Jiang, J., Yang, N., Duan, S., Jiang, Z.-H., Mei, Z.-T., Fei, J. y Guo, L.-H. (2004) 'Cognitive impairment in mice over-expressing gamma-aminobutyric acid transporter 1 (GAT1).', *Neuroreport*, 15(1), pp. 9–12.

Huang, F., Buchwald, P., Browne, C. E., Farag, H. H., Wu, W.-M., Ji, F., Hochhaus, G. y Bodor, N. (2001) 'Receptor binding studies of soft anticholinergic agents', *AAPS PharmSci*, 3(4), pp. 44–56. doi: 10.1208/ps030430.

Huerta-Rivas, A., Pérez-García, G., González-Espinosa, C. y Meneses, A. (2010) 'Time-course of 5-HT<sub>6</sub> receptor mRNA expression during memory consolidation and amnesia', *Neurobiology of Learning and Memory*. 93(1), pp. 99–110. doi: 10.1016/J.NLM.2009.08.009.

Kandel, E. R. (2001) 'The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses.', *Science*. 294(5544), pp. 1030–8. doi: 10.1126/science.1067020.

Kandel, E. R., Dudai, Y. y Mayford, M. R. (2014) 'The Molecular and Systems Biology of Memory', *Cell*. Cell Press, 157(1), pp. 163–186. doi: 10.1016/J.CELL.2014.03.001.

Karila, D., Freret, T., Bouet, V., Boulouard, M., Dallemagne, P. y Rochais, C. (2015) 'Therapeutic Potential of 5-HT<sub>6</sub> Receptor Agonists', *Journal of Medicinal Chemistry*. 58(20), pp. 7901–7912. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00179.

Katz, R. J. y Liebler, L. (1978) 'GABA involvement in memory consolidation: Evidence from posttrial amino-oxyacetic acid', *Psychopharmacology*. Springer-Verlag, 56(2), pp. 191–193. doi: 10.1007/BF00431848.

- Khoury, R., Grysman, N., Gold, J., Patel, K. y Grossberg, G. T. (2018) 'The role of 5-HT<sub>6</sub>-receptor antagonists in Alzheimer's disease: an update', *Expert Opinion on Investigational Drugs*. Taylor & Francis. 27(6), pp. 523–533. doi: 10.1080/13543784.2018.1483334.
- King, M. V, Spicer, C. H. y Sleight, A. J. (2009) 'Impact of regional 5-HT depletion on the cognitive enhancing effects of a typical 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist, Ro 04-6790, in the Novel Object Discrimination task', *6790*, pp. 111–123. doi: 10.1007/s00213-008-1334-1.
- Klinkenberg, I. y Blokland, A. (2010) 'The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: A review of animal behavioral studies', *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 34(8), pp. 1307–1350. doi: 10.1016/J.NEUBIOREV.2010.04.001.
- Kohen, R., Metcalf, M. A., Khan, N., Druck, T., Huebner, K., Lachowicz, J. E., Meltzer, H. Y., Sibley, D. R., Roth, B. L. y Hamblin, M. W. (1996) 'Cloning, Characterization, and Chromosomal Localization of a Human 5-HT<sub>6</sub> Serotonin Receptor', *Journal of Neurochemistry*. 66(1), pp. 47–56. doi: 10.1046/j.1471-4159.1996.66010047.x.
- Korte, M. y Schmitz, D. (2016) 'Cellular and System Biology of Memory: Timing, Molecules, and Beyond', *Physiological Reviews*, 96(2), pp. 647–693. doi: 10.1152/physrev.00010.2015.
- Kovacic, P. y Somanathan, R. (2010) 'Clinical physiology and mechanism of dizocilpine (MK-801): electron transfer, radicals, redox metabolites and bioactivity.', *Oxidative medicine and cellular longevity*. 3(1), pp. 13–22. doi: 10.4161/oxim.3.1.10028.
- Lewis, D. A., Volk, D. W. y Hashimoto, T. (2004) 'Selective alterations in prefrontal cortical GABA neurotransmission in schizophrenia: a novel target for the treatment of working memory dysfunction', *Psychopharmacology*, 174, pp. 143–150. doi: 10.1007/s00213-003-1673-x.
- Lisman, J. E., Coyle, J. T., Green, R. W., Javitt, D. C., Benes, F. M., Heckers, S. y Grace, A. A. (2008) 'Circuit-based framework for understanding neurotransmitter and risk gene interactions in schizophrenia.', *Trends in neurosciences*, 31(5), pp. 234–42. doi: 10.1016/j.tins.2008.02.005.
- Marcos, B., Cabero, M., Solas, M., Aisa, B. y Ramirez, M. J. (2010) 'Signalling pathways associated with 5-HT<sub>6</sub> receptors: relevance for cognitive effects', *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 13(6), pp. 775–784. doi: 10.1017/S146114570999054X.
- Marcos, B., Chuang, T. T., Gil-Bea, F. J. y Ramirez, M. J. (2008) 'Effects of 5-HT<sub>6</sub> receptor

antagonism and cholinesterase inhibition in models of cognitive impairment in the rat', *British Journal of Pharmacology*, 155(3), pp. 434–440. doi: 10.1038/bjp.2008.281.

Marcos, B., Gil-Bea, F. J., Hirst, W. D., García-Alloza, M. y Ramírez, M. J. (2006) 'Lack of localization of 5-HT<sub>6</sub> receptors on cholinergic neurons: implication of multiple neurotransmitter systems in 5-HT<sub>6</sub> receptor-mediated acetylcholine release', *European Journal of Neuroscience*, 24(5), pp. 1299–1306. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.05003.x.

Martin, D. L. y Rimvall, K. (1993) 'Regulation of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Synthesis in the Brain', *Journal of Neurochemistry*. Blackwell Publishing Ltd, 60(2), pp. 395–407. doi: 10.1111/j.1471-4159.1993.tb03165.x.

Masson, J., Emerit, M. B., Hamon, M. y Darmon, M. (2012) 'Serotonergic signaling: multiple effectors and pleiotropic effects', *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling*, 1(6), pp. 685–713. doi: 10.1002/wmts.50.

McNamara, R. K. y Skelton, R. W. (1993) 'Benzodiazepine receptor antagonists flumazenil and CGS 8216 and inverse-agonist  $\beta$ -CCM enhance spatial learning in the rat: Dissociation from anxiogenic actions', *Psychobiology*, 21(2), pp. 101–108. doi: 10.3758/bf03332033.

Meffre, J., Chaumont-Dubel, S., Mannoury la Cour, C., Loiseau, F., Watson, D. J. G., Dekeyne, A., Séveno, M., Rivet, J.-M., Gaven, F., Déléris, P., Hervé, D., Fone, K. C. F., Bockaert, J., Millan, M. J. y Marin, P. (2012) '5-HT<sub>6</sub> receptor recruitment of mTOR as a mechanism for perturbed cognition in schizophrenia.', *EMBO molecular medicine*, 4(10), pp. 1043–56. doi: 10.1002/emmm.201201410.

Meneses, A. (2001) 'Effects of the 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist Ro 04-6790 on learning consolidation', *Behavioural Brain Research*, 118(1), pp. 107–110. doi: 10.1016/S0166-4328(00)00316-8.

Meneses, A. (2003) 'A pharmacological analysis of an associative learning task: 5-HT<sub>1</sub> to 5-HT<sub>7</sub> receptor subtypes function on a pavlovian/instrumental autoshaped memory.', *Learning and memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 10(5), pp. 363–72. doi: 10.1101/lm.60503.

Meneses, A. (2007) 'Stimulation of 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A/2C</sub>, 5-HT<sub>3</sub> and 5-HT<sub>4</sub> receptors or 5-HT uptake inhibition: Short- and long-term memory', *Behavioural Brain Research*, 184(1), pp. 81–90. doi: 10.1016/J.BBR.2007.06.026.

Meneses, A. (2017a) 'Frameworking memory and serotonergic markers', *Reviews in the Neurosciences*,

28(5), pp. 547–563. doi: 10.1515/revneuro-2016-0079.

Meneses, A. (2017b) ‘Neural activity, memory, and dementias’, *Behavioural Pharmacology*, 28(2–3), pp. 132–141. doi: 10.1097/FBP.0000000000000279.

Meneses, A. y Liy-Salmeron, G. (2012) ‘Serotonin and emotion, learning and memory’, *Reviews in the Neurosciences*, 23(5–6), pp. 543–53. doi: 10.1515/revneuro-2012-0060.

Meneses, A., Perez-Garcia, G., Liy-Salmeron, G., Flores-Galvez, D., Castillo, C. y Castillo, E. (2008) ‘The effects of the 5-HT<sub>6</sub> receptor agonist EMD and the 5-HT<sub>7</sub> receptor agonist AS19 on memory formation’, *Behavioural Brain Research*, 195(1), pp. 112–119. doi: 10.1016/J.BBR.2007.11.023.

Millan, M. J., Agid, Y., Brüne, M., Bullmore, E. T., Carter, C. S., Clayton, N. S., Connor, R., Davis, S., Deakin, B., DeRubeis, R. J., Dubois, B., Geyer, M. A., Goodwin, G. M., Gorwood, P., Jay, T. M., Joëls, M., Mansuy, I. M., Meyer-Lindenberg, A., Murphy, D., Rolls, E., Saletu, B., Spedding, M., Sweeney, J., Whittington, M. y Young, L. J. (2012) ‘Cognitive dysfunction in psychiatric disorders: characteristics, causes and the quest for improved therapy’, *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(2), pp. 141–168. doi: 10.1038/nrd3628.

Moghaddam, B., Adams, B., Verma, A. y Daly, D. (1997) ‘NMDA receptor antagonists impair prefrontal cortex function as assessed via spatial delayed alternation performance in rats: modulation by dopamine.’, *The Journal of neuroscience*, 17(6), pp. 2921–2927.

Mondadori, C., Jaekel, J. y Preiswerk, G. (1993) ‘CGP 36742: The first orally active GABAB blocker improves the cognitive performance of mice, rats, and rhesus monkeys’, *Behavioral and Neural Biology*. 60(1), pp. 62–68. doi: 10.1016/0163-1047(93)90729-2.

Morris, B., Cochran, S. M. y Pratt, J. (2005) ‘PCP: from pharmacology to modelling schizophrenia’, *Current Opinion in Pharmacology*, 5(1), pp. 101–106. doi: 10.1016/J.COPH.2004.08.008.

Myhrer, T. (2003) ‘Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks’, *Brain Research Reviews*, 41(2–3), pp. 268–287. doi: 10.1016/S0165-0173(02)00268-0.

O’Connell, A. W., Fox, G. B., Kjølner, C., Gallagher, H. C., Murphy, K. J., Kelly, J. y Regan, C. M. (2001) ‘Anti-ischemic and cognition-enhancing properties of NNC-711, a  $\gamma$ -aminobutyric acid reuptake inhibitor’, *European Journal of Pharmacology*, 424(1), pp. 37–44. doi: 10.1016/S0014-

2999(01)01116-5.

Olney, J. W., Newcomer, J. W. y Farber, N. B. (1999) 'NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia', *Journal of Psychiatric Research*, 33(6), pp. 523–533. doi: 10.1016/S0022-3956(99)00029-1.

Pérez-García, G. y Meneses, A. (2005) 'Oral administration of the 5-HT receptor antagonists SB-357134 and SB-399885 improves memory formation in an autoshaping learning task', *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 81(3), pp. 673–682. doi: 10.1016/j.pbb.2005.05.005.

Preston, G. C., Broks, P., Traub, M., Ward, C., Poppleton, P. y Stahl, S. M. (1988) 'Effects of lorazepam on memory, attention and sedation in man', *Psychopharmacology*. 95(2), pp. 208–215. doi: 10.1007/BF00174511.

Rahman, A., Kim, H., Lee, K. H., Yun, H.-M., Hong, J.-H., Kim, Y., Choo, H., Park, M. y Rhim, H. (2017) '5-Hydroxytryptamine 6 Receptor (5-HT<sub>6</sub>R)- Mediated Morphological Changes via RhoA-Dependent Pathways', *Molecules and Cells*, 40(7), pp. 495–502. doi: 10.14348/molcells.2017.0080.

Renner, U., Oertel, R. y Kirch, W. (2005) 'Pharmacokinetics and pharmacodynamics in clinical use of scopolamine. - PubMed - NCBI', *Therapeutic Drug Monitoring*, 27(5), pp. 655–665.

Riccioni, T., Bordi, F., Minetti, P., Spadoni, G., Yun, H.-M., Im, B.-H., Tarzia, G., Rhim, H. y Borsini, F. (2011) 'ST1936 stimulates cAMP, Ca<sup>2+</sup>, ERK1/2 and Fyn kinase through a full activation of cloned human 5-HT<sub>6</sub> receptors', *European Journal of Pharmacology*, 661(1–3), pp. 8–14. doi: 10.1016/J.EJPHAR.2011.04.028.

Riemer Claus, Borroni, E., Levet-Trafit, B., Martin, J. R., Poli, S., Porter, R. H. P. and Bös, M. (2003) 'Influence of the 5-HT<sub>6</sub> Receptor on Acetylcholine Release in the Cortex: Pharmacological Characterization of 4-(2-Bromo-6-pyrrolidin-1-ylpyridine-4-sulfonyl)phenylamine, a Potent and Selective 5-HT<sub>6</sub> Receptor Antagonist', *Journal of Medicinal Chemistry*, 46(7), pp. 1273–1276. doi: 10.1021/jm021085c.

Rudolph, U. y Möhler, H. (2006) 'GABA-based therapeutic approaches: GABA<sub>A</sub> receptor subtype functions', *Current Opinion in Pharmacology*, 6(1), pp. 18–23. doi: 10.1016/J.COPH.2005.10.003.

Ruiz, A., Campanac, E., Scott, R. S., Rusakov, D. A. y Kullmann, D. M. (2010) 'Presynaptic GABA<sub>A</sub> receptors enhance transmission and LTP induction at hippocampal mossy fiber synapses.', *Nature neuroscience*, 13(4), pp. 431–8. doi: 10.1038/nn.2512.

- Salat, K., Podkowa, A., Mogilski, S., Zaręba, P., Kulig, K., Salat, R., Malikowska, N. y Filipek, B. (2015) 'The effect of GABA transporter 1 (GAT1) inhibitor, tiagabine, on scopolamine-induced memory impairments in mice', *Pharmacological Reports*, 67(6), pp. 1155–1162. doi: 10.1016/j.pharep.2015.04.018.
- Sarter, M. y Bruno, J. P. (2000) 'Cortical cholinergic inputs mediating arousal, attentional processing and dreaming: Differential afferent regulation of the basal forebrain by telencephalic and brainstem afferents', *Neuroscience*, 95(4), pp. 933–952. doi: 10.1016/S0306-4522(99)00487-X.
- Schechter, L. E., Lin, Q., Smith, D. L., Zhang, G., Shan, Q., Platt, B., Brandt, M. R., Dawson, L. A., Cole, D., Bernotas, R., Robichaud, A., Rosenzweig-Lipson, S. y Beyer, C. E. (2008) 'Neuropharmacological Profile of Novel and Selective 5-HT<sub>6</sub> Receptor Agonists: WAY-181187 and WAY-208466', *Neuropsychopharmacology*, 33(6), pp. 1323–1335. doi: 10.1038/sj.npp.1301503.
- Schmitt, U. y Hiemke, C. (2002) 'Tiagabine, a  $\gamma$ -amino-butyric acid transporter inhibitor impairs spatial learning of rats in the Morris water-maze', *Behavioural Brain Research*, 133(2), pp. 391–394. doi: 10.1016/S0166-4328(02)00008-6.
- Shi, J., Cai, Y., Liu, G., Gong, N., Liu, Z., Xu, T., Wang, Z. y Fei, J. (2012) 'Enhanced learning and memory in GAT1 heterozygous mice', *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 44(4), pp. 359–366. doi: 10.1093/abbs/gms005.
- Da Silva Costa-Aze, V., Quiedeville, A., Boulouard, M. y Dauphin, F. (2012) '5-HT<sub>6</sub> receptor blockade differentially affects scopolamine-induced deficits of working memory, recognition memory and aversive learning in mice', *Psychopharmacology*, 222(1), pp. 99–115. doi: 10.1007/s00213-011-2627-3.
- Solas, M., Puerta, E. y Ramirez, M. (2015) 'Treatment Options in Alzheimer's Disease: The GABA Story', *Current Pharmaceutical Design*, 21(34), pp. 4960–4971. doi: 10.2174/1381612821666150914121149.
- Song, I., Volynski, K., Brenner, T., Ushkaryov, Y., Walker, M. y Semyanov, A. (2013) 'Different transporter systems regulate extracellular GABA from vesicular and non-vesicular sources', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, p. 23. doi: 10.3389/fncel.2013.00023.
- Song, X., Jensen, M. Ø., Jogini, V., Stein, R. A., Lee, C.-H., Mchaourab, H. S., Shaw, D. E. y Gouaux, E. (2018) 'Mechanism of NMDA receptor channel block by MK-801 and memantine', *Nature*. doi: 10.1038/s41586-018-0039-9.

Stean, T. O., Hirst, W. D., Thomas, D. R., Price, G. W., Rogers, D., Riley, G., Bromidge, S. M., Serafinowska, H. T., Smith, D. R., Bartlett, S., Deeks, N., Duxon, M. y Upton, N. (2002) 'Pharmacological profile of SB-357134: A potent, selective, brain penetrant, and orally active 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist', *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 71(4), pp. 645–654. doi: 10.1016/S0091-3057(01)00742-0.

Suzdak, P. D., Frederiksen, K., Andersen, K. E., Sørensen, P. O., Knutsen, L. J. y Nielsen, E. B. (1992) 'NNC-711, a novel potent and selective  $\gamma$ -aminobutyric acid uptake inhibitor: pharmacological characterization.', *European Journal of Pharmacology*, 224(2–3), pp. 189–98.

Sweatt, J. D. (2010) *Mechanisms of memory*. 2nd Edition. Academic Press. Available at: <https://www.elsevier.com/books/mechanisms-of-memory/sweatt/978-0-12-374951-2>

Tassone, A., Madeo, G., Schirinzi, T., Vita, D., Puglisi, F., Ponterio, G., Borsini, F., Pisani, A. y Bonsi, P. (2011) 'Neuropharmacology Activation of 5-HT<sub>6</sub> receptors inhibits corticostriatal glutamatergic transmission', *Neuropharmacology*, 61(4), pp. 632–637. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.05.004.

Tellez, R., Gómez-Viquez, L. y Meneses, A. (2012) 'GABA, glutamate, dopamine and serotonin transporters expression on memory formation and amnesia', *Neurobiology of Learning and Memory*, 97(2), pp. 189–201. doi: 10.1016/j.nlm.2011.12.002.

Tremblay, R., Lee, S. y Rudy, B. (2016) 'GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits', *Neuron*. Elsevier, 91(2), pp. 260–292. doi: 10.1016/j.neuron.2016.06.033.

Vezzani, A., Serafini, R., Stasi, M. a, Caccia, S., Conti, I., Tridico, R. V y Samanin, R. (1989) 'Kinetics of MK-801 and its effect on quinolinic acid-induced seizures and neurotoxicity in rats.', *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 249(1), pp. 278–83.

Walther, D. J., Peter, J.-U., Bashammakh, S., Hörtnagl, H., Voits, M., Fink, H. y Bader, M. (2003) 'Synthesis of Serotonin by a Second Tryptophan Hydroxylase Isoform', *Science*, 299(5603).

Wang, H. y Sieburth, D. (2013) 'PKA Controls Calcium Influx into Motor Neurons during a Rhythmic Behavior', *PLoS Genetics*, 9(9), p. e1003831. doi: 10.1371/journal.pgen.1003831.

Wang, H. Y., Lu, C. W., Lin, T. Y., Kuo, J. R. y Wang, S. J. (2016) 'WAY208466 inhibits glutamate release at hippocampal nerve terminals', *European Journal of Pharmacology*. Elsevier, 781, pp. 117–127. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.04.010.

- West, P. J., Marcy, V. R., Marino, M. J., Schaffhauser, H. y Chester, W. (2009) 'Activation of the 5-HT<sub>6</sub> receptor attenuates long-term potentiation and facilitates GABAergic neurotransmission in rat hippocampus', *Neuroscience*, 164(2), pp. 692–701. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.07.061.
- Woods, S., Clarke, N., Layfield, R. y Fone, K. (2012) '5-HT<sub>6</sub> receptor agonists and antagonists enhance learning and memory in a conditioned emotion response paradigm by modulation of cholinergic and glutamatergic mechanisms', *British Journal of Pharmacology*, 167(2), pp. 436–449. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.02022.x.
- Woolley, M., Marsden, C. y Fone, K. (2004) '5-HT<sub>6</sub> Receptors', *Current Drug Target -CNS and Neurological Disorders*, 3(1), pp. 59–79. doi: 10.2174/1568007043482561.
- Yang, K., Belrose, J., Trepanier, C. H., Lei, G., Jackson, M. F. y MacDonald, J. F. (2011) 'Fyn, a Potential Target for Alzheimer's Disease', *Journal of Alzheimer's Disease*, 27(2), pp. 243–252. doi: 10.3233/JAD-2011-110353.
- Yau, S., Li, A. y So, K.-F. (2015) 'Involvement of Adult Hippocampal Neurogenesis in Learning and Forgetting', *Neural Plasticity*, 2015, pp. 1–13. doi: 10.1155/2015/717958.
- Yu, H., Chen, T., Zhou, L. y Tang, J. (2017) 'Effect of Selective 5-HT<sub>6</sub>R Agonist on Expression of 5-HT Receptor and Neurotransmitter in Vascular Dementia Rats', *Medical Science Monitor*, 23, pp. 818–825. doi: 10.12659/MSM.899067.
- Yun, H.-M., Baik, J.-H., Kang, I., Jin, C. y Rhim, H. (2010) 'Physical Interaction of Jab1 with Human Serotonin 6 G-protein-coupled Receptor and Their Possible Roles in Cell Survival', *Journal of Biological Chemistry*, 285(13), pp. 10016–10029. doi: 10.1074/jbc.M109.068759.
- Yun, H.-M., Kim, S., Kim, H.-J., Kostenis, E., Il Kim, J., Young Seong, J., Baik, J.-H. y Rhim, H. (2007) 'The novel cellular mechanism of human 5-HT<sub>6</sub> receptor through an interaction with fyn', *Journal of Biological Chemistry*, 282(8), pp. 5496–5505. doi: 10.1074/jbc.M606215200.
- Zarrindast, M. R., Bakhsha, A., Rostami, P. and Shafaghi, B. (2002) 'Effects of intrahippocampal injection of GABAergic drugs on memory retention of passive avoidance learning in rats', *Journal of Psychopharmacology*, 16(4), pp. 313–319. doi: 10.1177/026988110201600405.
- Zola-Morgan, S. and Squire, L. R. (1993) 'Neuroanatomy of Memory', *Annual Review of Neuroscience*, 16(1), pp. 547–563. doi: 10.1146/annurev.ne.16.030193.002555.

