



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**SEDE SUR
DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA**

**“Estudio farmacológico de la participación de los receptores 5-
HT_{1A} y 5-HT₇, y del enriquecimiento ambiental sobre la
recuperación de la memoria a largo plazo”**

**TESIS
que presenta
M. EN C. ROCÍO DEL CARMEN SOLÍS GUILLÉN**

Para obtener el grado de
Doctora en Ciencias
En la especialidad en Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Directores de tesis:
Dr. Alfredo Meneses Hernández †
Dr. David Centurión Pacheco

Ciudad de México,

Febrero, 2021

La fase experimental de la presente tesis se llevó a cabo en el laboratorio 15 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional a cargo del Dr. Alfredo Meneses Hernández. La fase de escritura del artículo y de la tesis estuvo bajo la dirección del Dr. David Centurión Pacheco y se llevó a cabo en el laboratorio 6 del departamento de Farmacobiología del CINVESTAV.

Rocío del Carmen Solís Guillén agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por la beca número 277701.

Agradecimientos

A Roberto González, técnico del laboratorio 15, gracias por la disposición y paciencia al enseñarme a manejar los animales y equipo del laboratorio.

Ing. Rodolfo Fernández, del laboratorio de electrónica, gracias por su siempre disposición para atender los detalles técnico-electrónico que se presentaron durante la realización de los experimentos.

Dr. Jorge Ramírez Salcedo, responsable de la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, gracias por la amabilidad y el curso que me permitió interpretar los resultados de microarreglos de ADN.

Agradecimientos

A el Dr. Alfredo Meneses QEPD por ser parte de mi formación académica.

A mi comité sinodal, Dr. Enrique Hong, gracias por sus preguntas y comentarios durante los avances, su experiencia enriqueció el proyecto.

Dr. Maximiliano Ibarra, gracias por realizar el viaje desde Iztacala cada vez que fue necesario, por sus comentarios, preguntas y sugerencias, siempre tuve algo que aprender de usted.

Dra. Gabriela Rodriguez, gracias por aceptar ser parte de mi sínodo, sus comentarios, observaciones y correcciones mejoraron por mucho el trabajo final.

Dra. Carolina López, gracias por aceptar evaluarme y permitirme contar con usted en la conclusión del proyecto.

Dr. Federico Bermúdez, muchas gracias por sus consejos, comentarios, sugerencias en la publicación del artículo y revisión de tesis, he aprendido mucho de usted y es un gran ejemplo a seguir.

Agradecimiento especial al Dr. David Centurión, primero por ser mi sínodo y después por ser mi tutor. Gracias por la paciencia, el tiempo dedicado y compromiso para sacar adelante y finalizar este proyecto. Gracias por permitirme ser parte del gran laboratorio 6.

De igual manera, mi agradecimiento se extiende a la Dra. Araceli Sánchez, gracias por los consejos, por las conversaciones y confianza, por el apoyo y soporte que usted representa dentro y fuera del laboratorio.

Por último, pero no por ello menos importante, agradezco a mis padres por todo lo que representan en mi vida. Gracias por estar conmigo en cada logro, por su apoyo incondicional, por su amor y paciencia, por ser esa fuerza en los momentos difíciles. Los amo y agradezco a la vida ser su hija.

A mi hermana y amigos, por los consejos, por escucharme, por estar presentes en las buenas y en las malas, por ser mis confidentes y cómplices, gracias por ser parte de mi vida.

A mis padres, por estar conmigo y tomar mi mano desde el día uno de preescolar hasta el día de hoy, por ser mi principal motivación y ejemplo de vida.

¡LOS AMO!

A mi hermana, por su apoyo incondicional.

A Adhara, por ser una razón de felicidad en mi vida.

Contenido

Resumen.....	IX
Abstract.....	X
Índice de tablas.....	XI
Índice de figuras.....	XII
Abreviaturas.....	XV
1. Introducción.....	1
1.1 Memoria.....	1
1.1.2 Consolidación de la memoria.....	1
1.1.3 Clasificación de la memoria.....	4
1.1.4 Formación de memoria.....	5
1.1.5 Circuito neural en el hipocampo de roedores.....	6
1.1.6 La región CA1.....	8
1.1.7 ¿Cómo se forma y almacena la memoria en esas regiones del cerebro?.....	9
1.1.8 Recuperación de la memoria.....	12
1.2 5-hidroxitriptamina (5-HT o serotonina).....	14
1.2.1 Síntesis y metabolismo de la 5-HT.....	15
1.2.2 Localización.....	16
1.2.3 Clasificación de los receptores a la 5-HT.....	19
1.2.4. Receptor 5-HT _{1A}	22
1.2.4.1 Efecto de agonistas y antagonistas del receptor 5-HT _{1A} en la memoria.....	23
1.2.5 Receptor 5-HT ₇	24
1.2.5.1 Efecto de los agonistas y antagonistas del receptor 5-HT ₇ en la memoria.....	26
1.2.6 Interacción entre los receptores 5-HT _{1A} Y 5-HT ₇	27
1.4 El enriquecimiento ambiental (EAM)......	30
1.5 Los microarreglos de ADN.....	31
2. Justificación.....	33
4. Objetivo General.....	35
4.1 Objetivos específicos.....	35

5. Materiales y métodos	36
5.1 Animales.....	36
5.2 Prueba de aprendizaje por automoldeamiento.....	36
5.2.1 Aparato.....	37
5.2.2 Habitación	37
5.2.3 Automoldeamiento.....	37
5.3 Administración de fármacos	39
5.3.1 Receptor 5-HT _{1A}	39
5.3.2 Receptor 5-HT ₇	39
5.3.3 Interacción de los receptores 5-HT _{1A} y 5-HT ₇	40
5.4 Fármacos	40
5.5 Administración intrahipocampal: cirugía estereotáxica	41
5.7 Microarreglos de ADN	46
5.8 Análisis estadístico	49
5.9. Diseño experimental.....	50
6. Resultados	51
6.1 Formación y recuperación de memoria	51
6.2 Efecto del L-triptófano en la recuperación de la memoria	51
6.3 Efecto de un agonista (8-OH-DPAT) y un antagonista (WAY 100635) de los receptores 5-HT _{1A} en la recuperación de la memoria.....	53
6.4 Efecto de un agonista (LP 211) y dos antagonistas (SB 269970 – LY 215840) de los receptores 5-HT ₇ en la recuperación de la memoria.	56
6.5 Efecto de las interacciones entre agonistas y antagonistas de los receptores 5-HT _{1A} y 5-HT ₇ en la recuperación de la memoria.	59
6.6 Efecto de las triples administraciones	60
6.7 Efecto de la administración de algunos fármacos en la región CA1 del hipocampo en la recuperación de la memoria.....	62
6.7.1 Efecto en la recuperación de la memoria de la administración de 8-OH-DPAT, WAY 100635, o LP 211 en la región CA1 del hipocampo.....	64
6.8 Efecto del enriquecimiento ambiental (EAM) en la recuperación de la memoria	65

6.8.1 Efecto del EAM antes y durante el protocolo experimental	65
6.8.2 Efecto del EAM durante el periodo de interrupción	67
6.8.3 Efecto del enriquecimiento ambiental y 8-OH-DPAT sobre la recuperación de la memoria	68
6.9 Análisis de Microarreglos	69
6.9.1 Análisis estadístico	71
6.9.2 Análisis bioinformático.....	72
7 Discusión.....	77
7.1 Formación y recuperación de memoria	77
7.3 Recuperación de la memoria y el receptor 5-HT _{1A}	78
7.4 Recuperación de la memoria y el receptor 5-HT ₇	79
7.5 Recuperación de la memoria y la interacción entre los receptores 5-HT _{1A} y 5- HT ₇	79
7.6 Posible mecanismo de acción	81
7.7 Recuperación de la memoria y la región CA1 del hipocampo	82
7.8 Recuperación de la memoria y el enriquecimiento ambiental	82
7.9. Recuperación de la memoria y microarreglos	83
8. Conclusiones.....	85
9. Perspectivas.....	86
10. Referencias bibliográficas	87
Anexo 1.	102

Resumen

La recuperación de memoria es el uso de información aprendida y representa un gran problema en pacientes con deficiencias de memoria donde el problema principal no es que no puedan aprender, si no, que no pueden recordar. En el presente trabajo exploramos el papel de 5-HT en la recuperación de la memoria mediante el uso de L-triptófano y varios ligandos de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇ con el paradigma de condicionamiento clásico. La administración sistémica de: (1) L-triptófano (50 y 100 mg/kg), (2) el agonista del receptor 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT (0.031 y 0.062 mg/kg), (3) el antagonista selectivo del receptor 5-HT_{1A}, WAY 100635 (0.3 y 0.6 mg/kg), (4) el agonista del receptor 5-HT₇, LP 211, mejoraron, de una manera dependiente de la dosis (1, 2.5, 5.0 y 10.0 mg/kg), la recuperación de la memoria. Además, el antagonista del receptor 5-HT₇, SB 269970 (1.0 y 10.0 mg/kg), y el antagonista no específico de 5-HT₂/5-HT₇, LY 215840 (1.0 y 20.0 mg/kg), no tuvieron ningún efecto. Finalmente, el SB 269970 (10.0 mg/kg) bloqueó significativamente la mejora de la recuperación de la memoria producida por la dosis de 10.0 mg/kg de LP 211, pero no la inducida por 2.5 mg/kg. Posteriormente, realizamos coadministraciones de los agonistas del receptor 5-HT_{1A} o 5-HT₇ con los antagonistas del receptor 5-HT_{1A} o 5-HT₇. Se analizaron varios grupos, entre ellos sobresalen: 1) WAY 100635 (0.3 mg / kg) + SB 269970 (1.0 mg / kg) + LP 211 (5.0 mg / kg) que no tuvo efecto sobre la recuperación de la memoria y, 2) WAY 100635 (0.3 mg/kg) + SB 269970 (1.0 mg/kg) + 8-OH-DPAT (0.031 mg/kg) que mejoró la recuperación de la memoria. En conjunto, estos resultados sugieren que la activación de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇ podrían ser blancos terapéuticos para facilitar la recuperación de la memoria a largo plazo. Por otro lado, la administración de 8-OH-DPAT, WAY 100635 y LP 211 en la región CA1 del hipocampo no tuvo efecto sobre la recuperación de la memoria. Por último, el enriquecimiento ambiental mejoró la recuperación de la memoria cuando se implementó después de la última sesión de consolidación de la memoria. Los microarreglos de ADN mostraron que durante la recuperación de memoria se activan diversas vías metabólicas, entre ellas y de manera importante la vía de calcio y la de LTP, que promueven la neurogénesis y formación de memoria, respectivamente.

Abstract

Memory retrieval is the use of learned information and represents a big problem in patients with memory deficits where the main issue is that they can learn but cannot remember. Hence, here we are exploring the role of 5-HT in memory retrieval by the use its metabolic precursor L-tryptophan and several ligands at 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors in an autoshaping learning task. Systemic administration of: (1) L-tryptophan (50 and 100 mg/kg), (2) 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT (0.031 and 0.062 mg/kg), (3) the selective antagonist 5-HT_{1A} receptor WAY 100635 (0.3 and 0.6 mg/kg), (4) the 5-HT₇ receptor agonist, LP 211, in a dose-dependent manner (1, 2.5, 5.0 and 10.0 mg/kg) enhanced memory retrieval. Further, the 5-HT₇ receptor antagonist, SB 269970 (1.0 and 10.0 mg/kg) and non-specific antagonist LY 215840 (1.0 and 20 mg/kg) had no effect. SB 269970 (10.0 mg/kg) significantly blocked memory retrieval enhancement produced by 10.0 mg/kg LP 211, but not that induced by 2.5 mg/kg LP 211. After that, we made co-administrations between receptor agonists 5-HT_{1A} or 5-HT₇ with receptor antagonists 5-HT_{1A} or 5-HT₇. Many groups were tested, two mainly groups were interesting: 1) WAY 100635 (0.3 mg/kg) + SB 269970 (1.0 mg/kg) + LP 211 (5.0 mg/kg) had not effect over memory recovery but, 2) WAY 100635 (0.3 mg/kg) + SB 269970 (1.0 mg/kg) + 8-OH-DPAT (0.031 mg/kg) enhanced memory retrieval. These results, taken together, suggest that activation of 5-HT_{1A} and 5-HT₇ may be therapeutic targets to improve long-term memory retrieval. On the other hand, the administration of 8-OH-DPAT, WAY 100635 and LP 211 in CA1, region of the hippocampus, had no effect in memory recovery. Finally, environmental enrichment, a non-pharmacological therapeutic alternative that is proposed as a treatment for memory deficits, improved memory retrieval when was implemented after memory consolidation. DNA microarrays showed that during recovery memory many metabolic pathways are activated, including significantly and the calcium pathway and LTP, promoting neurogenesis and memory formation, respectively.

Índice de tablas

Tabla 1: Receptores a 5-HT	19
Tabla 2. Afinidad de 5-HT a sus receptores	21
Tabla 3. Afinidades.....	41
Tabla 4. Curso temporal de la formación de memoria (%RC)	63
Tabla 5 Genes expresados	72

Índice de figuras

Figura 1 Diagrama general de la formación de memoria.	2
Figura 2. Tipos de consolidación.....	3
Figura 3. Hipocampo en el cerebro humano y en cerebro de rata.	6
Figura 4. Red neuronal del hipocampo.	7
Figura 5. Anatomía básica del hipocampo.	8
Figura 6. Región CA1 del hipocampo de rata y de ser humano.....	9
Figura 7. Sensibilización a corto y largo plazo del reflejo de abstinencia branquial en <i>Aplysia</i> . Tomado de Mayford, 2012.....	11
Figura 8. Recuperación de la memoria.	13
Figura 9. Estructura molecular de 5-HT.	15
Figura 10. Síntesis y metabolismo de la 5-hidroxitriptamina. Tomado de Hansler, 2012.	17
Figura 11. 5-HT en el cerebro. Tomado de Lesch & Waider, 2012	18
Figura 12. Vista integrada de la señalización en neuronas serotoninérgicas. Tomado de Millan et al., 2008.	20
Figura 13. Vía de señalización del receptor 5-HT _{1A} . Tomado de Ritcher et al., 2003.	22
Figura 14. Regulación de la actividad del receptor 5-HT ₇ por palmitoilación dinámica.....	24
Figura 15. Vías de señalización del receptor 5-HT ₇ . Tomado de Ritcher et al., 2003.	26
Figura 16. Enriquecimiento ambiental.....	31
Figura 17. Protocolo experimental.....	38
Figura 18. Coordenadas del área de administración bilateral.	42
Figura 19. Región CA1 del hipocampo, área de administración.....	42
Figura 20. Protocolo experimental de la administración intrahipocampal.....	43
Figura 21. Enriquecimiento ambiental.	44
Figura 22. Alojamiento estándar.....	44
Figura 23. Diseño experimental de enriquecimiento ambiental (EAM). Alojamiento estándar (AES).....	45

Figura 24. Protocolo experimental para el análisis de microarreglos.	47
Figura 25. Purificación del ARN.	48
Figura 26. Geles de electroforesis.....	48
Figura 27. Diseño experimental.....	50
Figura 28. Formación y recuperación de memoria.	52
Figura 29. Efecto del L-triptófano en la recuperación de la memoria.	53
Figura 30. .Efecto del 8-OH-DPAT en la recuperación de la memoria.	54
Figura 31. Efecto de WAY 100635 en la recuperación de la memoria.	55
Figura 32. Efecto de la co-administración de 8-OH-DPAT + WAY 100635 en la recuperación de la memoria.	56
Figura 33. Efecto del LP 211 en la recuperación de la memoria.	57
Figura 34. Efecto del SB 269970 y LY 215840 en la recuperación de la memoria.	58
Figura 35. Efecto de la coadministración de SB 269970 + LP 211 en la recuperación de la memoria.	58
Figura 36. Efecto de la interacción entre agonistas y antagonistas de 5-HT _{1A} y 5-HT ₇	60
Figura 37. Efecto de la triple administración en la recuperación de la memoria. ..	61
Figura 38. Región CA1 del hipocampo (corte coronal).....	62
Figura 39. Curva de formación y recuperación de la memoria en dos vías de administración.	63
Figura 40. Efecto en la recuperación de la memoria de la administración de 8-OH- DPAT y WAY 100635 en la región CA1 del hipocampo.	64
Figura 41. Efecto en la recuperación de la memoria de la administración de LP 211 en la región CA1 del hipocampo.	65
Figura 42. Efecto del EAM antes y durante el protocolo experimental.	66
Figura 43. Efecto del enriquecimiento ambiental previo al protocolo de experimentación.	66
Figura 44. Efecto del enriquecimiento ambiental durante el periodo de interrupción. EAM, enriquecimiento ambiental; AES, alojamiento estándar.....	67

Figura 45. Efecto de 8-OH-DPAT y el enriquecimiento ambiental. EAM, enriquecimiento ambiental; AES, alojamiento estándar.	68
Figura 46. Chip de microarreglo donde se comparó G1, grupo control que no tuvo recuperación de memoria (216 h) con G3, grupo de máxima retención (48 h).	70
Figura 47. Chip de microarreglos donde se comparan los grupos G1, grupo control que no tuvo recuperación de memoria (216 h), con G2, grupo que mejoró la recuperación de memoria con WAY 100635 (216 h).....	71

Abreviaturas

5-HIAA	Ácido 5-hidroxi-indolacético
5-HT	5-hidroxitriptamina
AC	Adenilato ciclasa
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulina Proteína cinasa II
CCA	Corteza cingulada anterior
Cdk5	Cinasa dependiente de ciclina
CE	Corteza Entorrinal
CPF	Corteza prefrontal
CREB	proteína de unión al elemento de respuesta al AMP
CRS	Corteza retrosplenial
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
DAT	Transportador de dopamina
DR	Rafé dorsal
GAT1	Transportador tipo 1 de GABA
GD	Giro dentado
GIRK	Canales rectificadores de potasio
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G
HPC	Hipocampo
ISRS	Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina
LTP	Potenciación a largo plazo
LTD	Depresión a largo plazo
MAO	Monomino oxidasa
MAPK	proteína cinasas activadas por mitógenos
MCP	Memoria a corto plazo
MFB	MFB, haz frontal medial
MLP	Memoria a largo plazo
MR	Rafé mediaL
mTOR	Marcador de rapamicina en células de mamífero
NMDA	ácido N-metil-D-aspártico
NO	Óxido nítrico

Orb	Corteza orbitofrontal
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PLA	Fosfolipasa A
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
PP1	Proteína fosfatasa 1
RC	Respuestas condicionadas
SERT	Transportador de serotonina
SNC	Sistema Nervioso Central
SUB	Subículo
TA	Vía temporoamónica
VLP	Vía lateral perforante
VP	Vía perforante
VPM	Vía perforante medial

1. Introducción

1.1 Memoria

La memoria es fundamental para la vida humana. Citando a Eric R. Kandel “somos quienes somos en gran parte debido a lo que hemos aprendido y lo que recordamos” (Kandel et al., 2014). La capacidad del cerebro para almacenar información acerca de las experiencias pasadas y actuales, así como poder recuperarlas en un momento posterior, permite la continuidad y la cohesión entre eventos sucesivos en la vida de un sujeto, definiendo así su individualidad (Tsien, 2012). En este sentido, el aprendizaje se describe como el mecanismo por el cual se adquiere nueva información sobre el mundo y a la memoria como el mecanismo por el cual aquel conocimiento se consolida, almacena y se recupera (Kandel et al., 2014).

La memoria es el resultado de varios procesos dinámicos e interactivos: codificación o adquisición de nueva información (registro sensorial), la memoria a corto plazo, la consolidación y el mantenimiento de la memoria a largo plazo (explícita o implícita) y la desestabilización o la reestabilización de la memoria en la recuperación (Fig.1) (Izquierdo et al., 1999; Kandel et al., 2014; Wang & Tsien, 2006).

1.1.2 Consolidación de la memoria

La memoria también se define como la retención en el tiempo de representaciones internas dependientes de la experiencia o de la capacidad para reactivar o reconstruir tales representaciones (Dudai, 2002). Esta retención en el tiempo es consecuencia de un proceso que se denomina consolidación de la memoria.

La consolidación de la memoria es un proceso hipotético en el que un elemento en la memoria se transforma en una forma a largo plazo. Generalmente se aborda en dos niveles complementarios de descripción y análisis: el nivel celular-sináptico (consolidación sináptica) y el nivel de los sistemas cerebrales (consolidación de sistemas) (Dudai, 2012; Dudai et al., 2015).

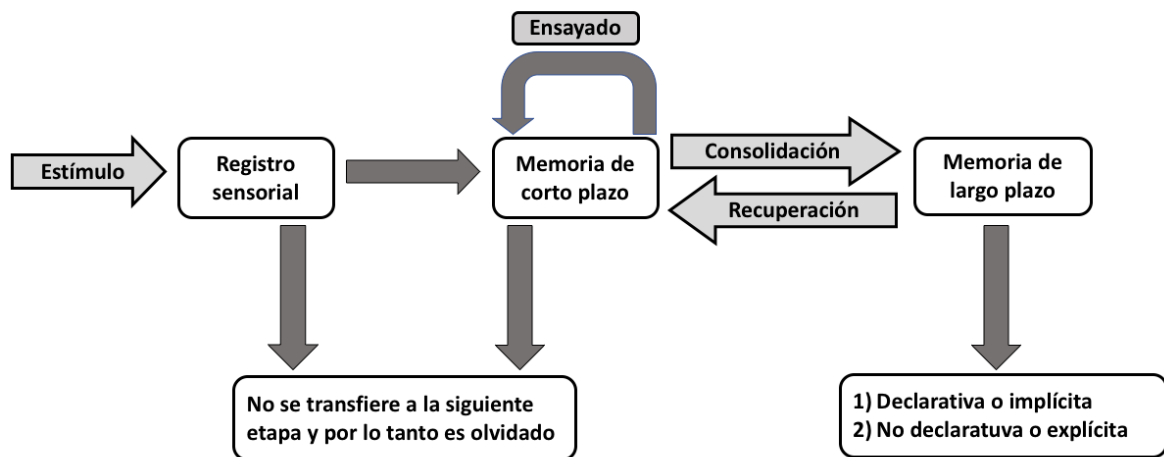


Figura 1 Diagrama general de la formación de memoria.

La consolidación de la memoria desempeña un papel clave en la formación de memoria, ya que determina qué se conservará después de la codificación inicial y cuánto tiempo llevará este proceso (Fig. 2). Una vez que termina la consolidación se forma una huella de memoria, la cual no puede interrumpirse por eventos posteriores y permanece fija (Nadel et al., 2012).

Como previamente se mencionó, la consolidación de la memoria se lleva a cabo en dos niveles de descripción y análisis:

1) Consolidación sináptica. Se refiere a la transformación de la información post-codificada en una forma a largo plazo en los nodos sinápticos y celulares locales en el circuito neural que codifica la memoria. El dogma central actual de consolidación sináptica es el que implica la estimulación de receptores en una neurona que induce la activación de la cascadas de señalización intracelular, lo que da por resultado la modulación de la expresión génica y la síntesis de nuevas proteínas que en modificaciones post-transcripcionales y alteran la eficacia sináptica. Este tipo de consolidación asume una terminación o cierre dentro de las horas siguientes a su inicio, al final de las cuales se vuelve resistente a una serie de agentes que de otra manera podrían evitar que la memoria sea convertida en su forma a largo plazo (agentes amnésicos, como estímulos de distracción, y agentes farmacológicos (Dudai et al., 2015).

2) Consolidación de sistemas. Se refiere a la reorganización posterior a la codificación de las representaciones de memoria a largo plazo en circuitos cerebrales distribuidos (Dudai & Morris, 2002). Este tipo de consolidación implica oleadas recurrentes de consolidación sináptica en los nuevos entornos cerebrales que reciben información nueva o reprocesada que depende de la experiencia, es decir, la consolidación sináptica podría considerarse como una subrutina en la consolidación de sistemas (Dudai et al., 2015). Este tipo de consolidación, que dura semanas o más y durante la cual la memoria se vuelve independiente del hipocampo, se observa en la memoria declarativa (Dudai, 2004; Kim & Fanselow, 1992).

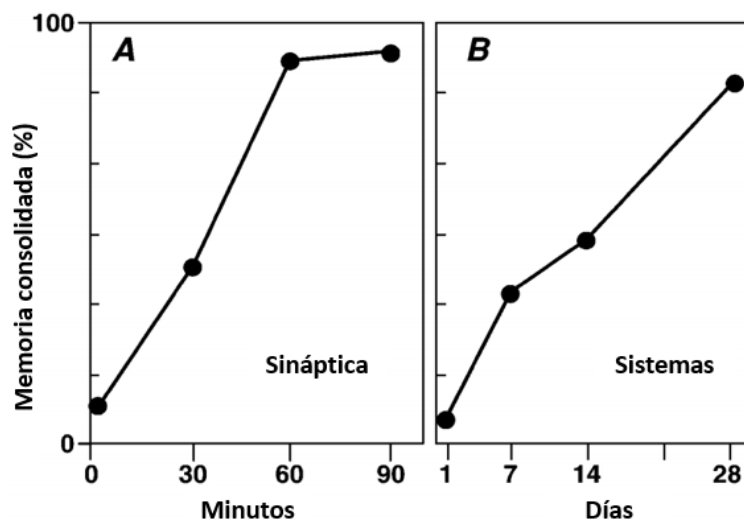


Figura 2. Tipos de consolidación.

Mediante el proceso de consolidación, el hipocampo gradualmente se vuelve menos importante para el almacenamiento y la recuperación, y se desarrolla una memoria más permanente en regiones distribuidas de la neocorteza. La idea no es que la memoria se transfiera literalmente del hipocampo a la neocorteza, ya que la información se codifica tanto en la neocorteza como en el hipocampo en el momento del aprendizaje. La idea es que los cambios graduales en la neocorteza, que comienzan en el momento del aprendizaje, establezcan una memoria estable a largo plazo al aumentar la complejidad, la distribución y la conectividad entre múltiples regiones corticales (Dudai, 2004).

1.1.3 Clasificación de la memoria

La memoria se puede dividir de acuerdo al curso temporal en que se consolida en memoria a corto plazo (MCP), que va en el orden de segundos hasta 3 o 6 horas y en memoria a largo plazo (MLP) que va en un curso de tiempo de semanas, meses y años. Una diferencia crítica entre la MCP y MLP es que la formación de la MLP requiere de la expresión génica. Esto implica no solo la transcripción de nuevos ARNm en las neuronas que codifican la memoria, sino también la traducción de los ARNm inactivos almacenados en las sinapsis que se activan por la experiencia. Por lo tanto, la consolidación de memorias a largo plazo requiere la traducción local de ARNm tanto a nivel celular como local (sinapsis) que conlleva a la consolidación de sistemas (previamente descrita) (Izquierdo et al., 1999; Sudhakaran & Ramaswami, 2017; Wang et al., 2006).

Por otra parte, la memoria también se puede dividir de acuerdo a su contenido y tipos de consolidación en memoria declarativa, para hechos y eventos, personas, lugares y objetos; y memoria no declarativa, para capacidades perceptivas y motoras (Kandel et al., 2014).

1) Memoria declarativa o explícita. Este tipo de memoria se divide en dos subclases: episódica (eventos) y semántica (hechos). Ambas requieren un conocimiento explícito de la información para la recuperación. Se caracteriza por el recuerdo consciente de información de lugares, eventos, hechos y personas; también se caracteriza por el recuerdo no consciente de tareas, como las habilidades motoras. Este tipo de memoria tiende a formarse con facilidad y a ser olvidada fácilmente (Tsien, 2012). La memoria declarativa no se establece inmediatamente como memoria a largo plazo (LTM), sino que conlleva una secuencia de procesos moleculares específicos en el área CA1 del hipocampo y sus conexiones, proceso que dura de 3 a 6 h (Izquierdo et al., 1999). La memoria episódica, se refiere a la memoria de acontecimientos episódicos que contienen información de qué, dónde, cuándo, y es el tipo principal de memoria codificada en nuestra vida diaria. La memoria semántica se refiere a la memoria de hechos y conocimientos que son atribuibles a cualquier ocasión especial en la vida (sin que necesariamente se recuerde dónde y cuándo lo adquirió) (Tsien, 2012).

2) La memoria no declarativa, implícita o procedimental, es una colección de facultades de memoria que no requieren un conocimiento consciente para la recuperación. Abarca una variedad de aprendizajes de habilidades y procedimientos perceptuales y motores finamente ajustados que uno no puede describir verbalmente. La mayoría de los tipos de memoria no declarativa funcionan para apoyar el aprendizaje gradual e incremental. Es decir, el comportamiento se modifica a través de la práctica, la experiencia o múltiples pruebas. Un ejemplo típico es andar en bicicleta: es posible que él o ella no haya montado una bicicleta en muchos años, pero cuando vuelve a andar en bicicleta, "simplemente sabe cómo andar en ella". Las categorías más comunes de memoria no declarativa son (a) aprendizaje de habilidades motoras, (b) preparación ("priming") y (c) condicionamiento clásico. Cada una depende de diferentes áreas neuronales. Las habilidades motoras pueden contener un componente declarativo (para detener la bicicleta, frenar). Sin embargo, su ejecución fluida no se logra mediante el aprendizaje y la repetición frecuente de las "reglas" declarativas, sino de la práctica motora. La información está codificada en sus músculos y articulaciones; no es accesible para la consciencia. Otra forma de memoria no declarativa es el "priming". Este tipo de memoria consiste en que después de una exposición al estímulo, se facilita la respuesta a ese estímulo. Finalmente, el condicionamiento clásico ocurre cuando dos estímulos que no ocurren simultáneamente se asocian entre sí a través del emparejamiento repetido. Por lo general, uno de los estímulos, el estímulo no condicionado, evoca una respuesta de alta probabilidad de ocurrencia o incluso una refleja (es decir, comportamientos que ocurren de manera automática e involuntaria) denominada respuesta no condicionada (Bauer, 2013; Lynch, 2004; Squire, 2004; Wang et al., 2006).

1.1.4 Formación de memoria

Se ha propuesto que no existe un solo centro de memoria en el cerebro, sino más bien que la memoria está codificada a lo largo de muchas áreas en el cerebro por un conjunto de circuitos específicos y procesos moleculares secuenciales y complejos que se llevan a cabo en las neuronas. En los mamíferos, la memoria

explícita depende de la integridad del lóbulo temporal, incluyendo el hipocampo y las cortezas entorrinal, perirrinal y parahipocampal, y la memoria implícita implica estructuras como el cerebelo, el estriado y los ganglios basales, amígdala y neocorteza (Fig. 3) (Bizon, 2005; Izquierdo et al., 2002; Wang & Tsien, 2006).

Sin embargo, una de las áreas cerebrales con mayor participación e importancia es el hipocampo, ya que juega un papel fundamental en algunas formas de aprendizaje y se requiere para el proceso inicial de formación permanente de la memoria (Li et al., 2009) (Fig. 3). Después de la adquisición de memoria, la dependencia del hipocampo disminuye gradualmente con el tiempo, mientras que la dependencia cortical del recuerdo de memoria aumenta (Terranova et al., 2019). Se cree que esta decadencia de la dependencia del hipocampo es un proceso activo y desempeña un papel en la eliminación de los viejos recuerdos del hipocampo una vez que la memoria se ha almacenado en las redes corticales, lo que permite que el hipocampo almacene continuamente nueva información (Kitamura & Inokuchi, 2014)

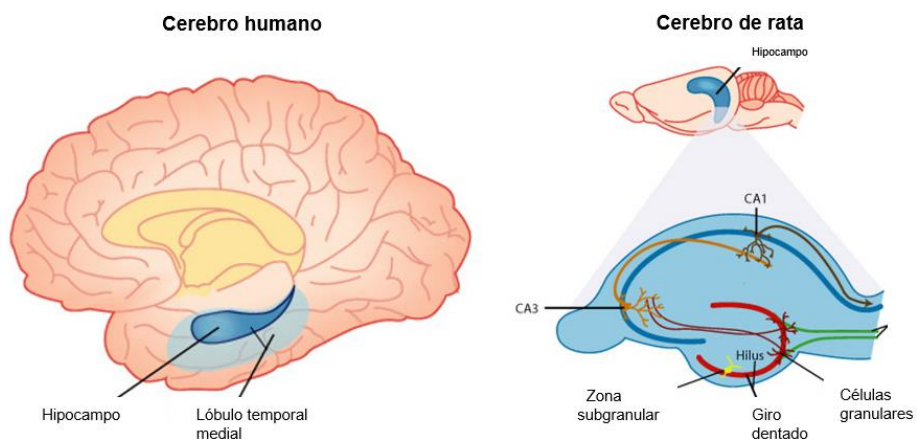


Figura 3. Hipocampo en el cerebro humano y en cerebro de rata.

1.1.5 Circuito neural en el hipocampo de roedores

Hay dos circuitos excitadores principales dentro de la corteza entorrinal (CE) y redes neuronales en el hipocampo: (1) la vía directa (CE capa III → hipocampo CA1 → capa CE V), y (2) la vía trisináptica indirecta (capa II de CE → hipocampo

GD → hipocampo CA3 → hipocampo CA1 → capa CE V) (Fig. 4) (Neves et al., 2008).

Los axones de las neuronas de la capa II en la corteza entorrinal proyectan hacia el giro dentado a través de la vía perforante (VP), incluida la vía lateral perforante (VLP) y la vía perforante medial (VPM). El giro dentado envía proyecciones a las células piramidales en la región CA3 a través de las fibras musgosas. Las neuronas piramidales de CA3 transmiten la información a las neuronas piramidales de CA1 a través de colaterales de Schaffer. Las neuronas piramidales de CA1 envían proyecciones hacia las neuronas de capa profunda de la CE. La región CA3 también recibe proyecciones directas de las neuronas de la capa II de la CE a través de la vía perforante (VP). La región CA1 recibe información directa de las neuronas de la capa III de la CE a través de la vía temporoamónica (TA). Las células granulares dentadas también proyectan hacia las células musgosas del hilio y las interneuronas hiliares (en el giro dentado), que envían proyecciones excitadoras e inhibitorias, respectivamente, de regreso a las células granulares. (Deng et al., 2010; Kitamura & Inokuchi, 2014; Li et al., 2009) (Fig. 5).

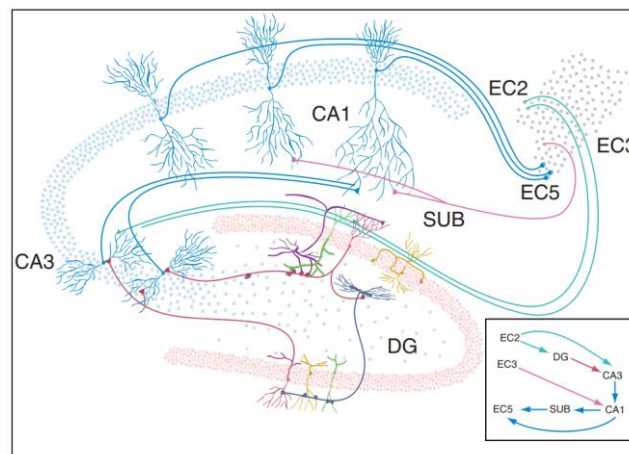


Figura 4. Red neuronal del hipocampo.

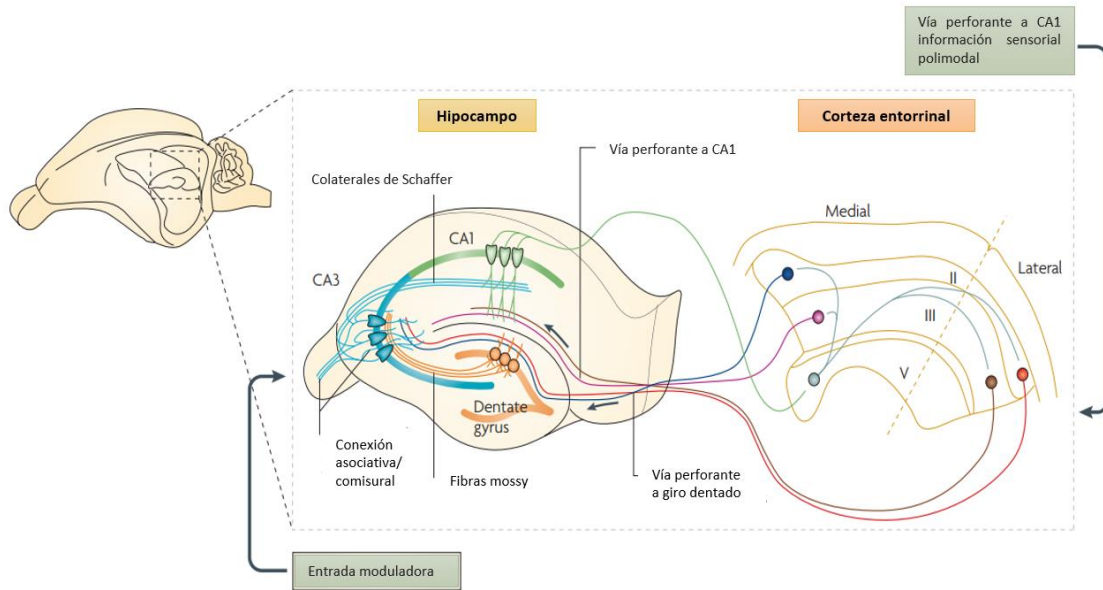


Figura 5. Anatomía básica del hipocampo.

1.1.6 La región CA1

La formación hipocampal se estudia ampliamente en parte debido a su organización distintiva y altamente laminar, así como a su papel fundamental demostrado en el aprendizaje y la memoria (Li et al., 2009; Neves et al., 2008). En este trabajo haremos especial énfasis en la región CA1 del hipocampo (Fig. 6).

La región CA1, con sus proyecciones generalizadas, es el punto de salida clave del circuito de la memoria en el hipocampo. Sin embargo, se han propuesto varias funciones adicionales para la región CA1, incluida la detección de novedades, la comparación de la información que ingresa al hipocampo y el enriquecimiento de la información que salen del hipocampo, efectos potencialmente mediados por la redistribución de información de la región CA3 a través de un mayor número de neuronas de salida (Soltesz & Losonczy, 2018). La vía de salida del hipocampo, la región CA1, proyecta directamente a varias áreas corticales (corteza prefrontal, CPF; corteza anterior del cíngulo, CCA; corteza retrosplenial, CRS; corteza orbitofrontal, Orb) o a través de la capa V de la corteza entorrinal (CE) para conectar al hipocampo con varias estructuras corticales que eventualmente almacenan rastros de memoria a largo plazo (Kitamura & Inokuchi, 2014).

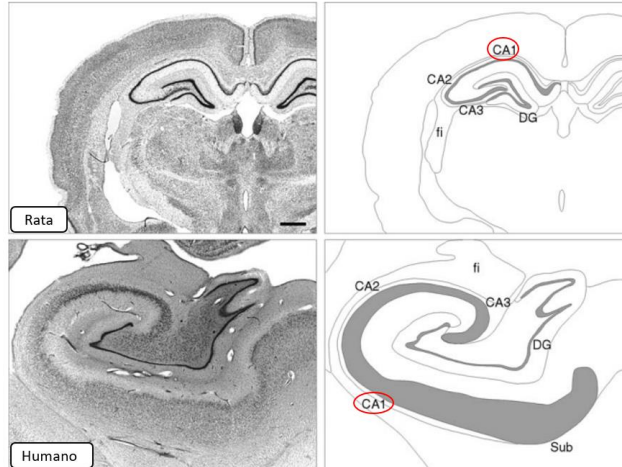


Figura 6. Región CA1 del hipocampo de rata y de ser humano.

1.1.7 ¿Cómo se forma y almacena la memoria en esas regiones del cerebro?

En 1894, Ramón y Cajal propuso por primera vez que la memoria se almacena como un cambio anatómico en la fuerza de las conexiones neuronales, más tarde llamadas sinapsis (Sherrington 1897). Esa modulación de la conectividad sináptica es un mecanismo crítico de aprendizaje que Hebb incorporó en modelos más refinados en las décadas de 1940 y 1950 (Mayford et al., 2012; Tsien, 2012). En 1949, el psicólogo canadiense Donald O. Hebb explicó de manera sencilla, pero trascendente, cómo se representa y almacena la memoria en el cerebro. El postulado de Hebb (Hebb, 1949) indica: “cuando un axón de la célula A está lo suficiente cerca para excitar una célula B y de manera repetida o consistentemente está involucrado en el disparo de ésta, se llevan a cabo algunos procesos de crecimiento o cambios metabólicos en una o ambas células, de esta manera la eficiencia de las neuronas A, en el disparo de las neuronas B, se aumenta.”, (Martin et al., 2000).

Aunque se han requerido algunas modificaciones menores a lo largo de los años, la esencia de la regla de Hebb permanece sin cambios: un recuerdo es producido por la actividad neuronal coincidente; cuando dos células nerviosas conectadas están activas simultáneamente, la fuerza de su conexión sináptica aumenta; esto confiere una base para la persistencia de la memoria.

Los primeros intentos de identificar cambios neuronales que subyacen al aprendizaje y la memoria utilizaron formas simples de memoria de procedimiento, como la habituación, la sensibilización y el condicionamiento clásico. Estos estudios tenían como principal objetivo identificar los sitios y las bases celulares, dentro de un circuito neuronal, que se modifican mediante el aprendizaje y que se utilizan para el almacenamiento de memoria (Mayford et al., 2012).

En este sentido, Kandel en 1976, en un modelo en *Aplysia* (caracol marino), exploró el aprendizaje y la memoria a corto plazo (Castellucci & Kandel, 1976). Un mecanismo de aprendizaje y memoria a corto plazo evidente en el reflejo de abstinencia branquial de *Aplysia* (la retirada de la branquia tras la estimulación del sifón). El aprendizaje está dado por un cambio en la fuerza sináptica provocado por la modulación dada a través de la liberación de un neurotransmisor. La habituación del reflejo a corto plazo se asocia con la disminución en la liberación del neurotransmisor, mientras que durante la deshabituación y la sensibilización a corto plazo ocurre un aumento en la liberación del neurotransmisor. Estos fenómenos de plasticidad sináptica se producen tanto en las neuronas sensoriales que detectan la estimulación del sifón, como en las neuronas motoras que controlan la respuesta refleja y modulan directamente su magnitud. Estos estudios proporcionaron la primera evidencia de la idea de que la memoria conductual está mediada por la plasticidad en las conexiones sinápticas entre las neuronas que participan en el comportamiento (Kandel, 2001).

La sensibilización a corto y largo plazo del reflejo de abstinencia branquial en *Aplysia* implica modificaciones y alteraciones postraduccionales en la síntesis de proteínas.

Estas modificaciones son: (1) Antes del aprendizaje: un estímulo táctil al sifón de *Aplysia* hace que una neurona sensorial libere glutamato para excitar una neurona motora y que *Aplysia* retraiga el sifón; (2) sensibilización a corto plazo: un choque en la cola de *Aplysia* provoca la liberación de serotonina de las interneuronas que actúa sobre los receptores 5-HT₇ para la activación de una proteína G estimuladora (Gs), que activa la adenilato ciclasa (AC), lo que lleva a la fosforilación dependiente de AMPc y PKA de diferentes sustratos, incluidos los

canales K^+ y Ca^{2+} , lo que mejora la liberación de glutamato desde las terminales de las neuronas sensoriales; y (3) Sensibilización a corto plazo: los choques repetidos en la cola provocan un aumento persistente en AMPc, lo que lleva a una transcripción génica alterada y una síntesis de proteínas (Fig. 7). Esto conduce a la formación de nuevas sinapsis (Mayford et al., 2012).

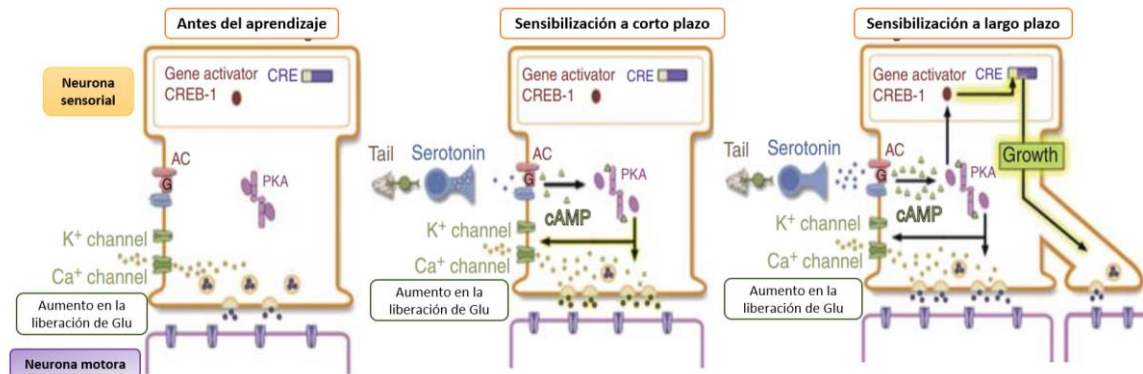


Figura 7. Sensibilización a corto y largo plazo del reflejo de abstinencia branquial en *Aplysia*. Tomado de Mayford, 2012.

Estudios del reflejo de abstinencia branquial también revelaron que incluso las formas elementales de aprendizaje tienen distintas etapas de almacenamiento de memoria a corto y largo plazo. Además de los cambios inmediatos a corto plazo en la función sináptica con el aprendizaje, cambios estructurales acompañan el almacenamiento de la memoria a largo plazo, tanto en la habituación como en la sensibilización del reflejo de abstinencia branquial (Mayford et al., 2012).

Se ha descrito que el aprendizaje y la memoria requieren cambios persistentes en los circuitos neuronales. El aprendizaje y la memoria requieren cambios persistentes en los circuitos neuronales. Particularmente, los circuitos del hipocampo, previamente descritos, presentan plasticidad sináptica rápida y persistente. Bliss et al. (1973) descubrieron que la estimulación eléctrica de alta frecuencia en los circuitos del hipocampo produce una mejora de las respuestas sinápticas que duró horas *in vitro* y de días a semanas *in vivo*. A esta respuesta duradera la denominaron “potenciación a largo plazo” (LTP), (Bliss & Lømo, 1973).

El descubrimiento de la LTP y de la depresión a largo plazo (LTD), que produce una reducción de las respuestas sinápticas en una estructura cerebral

asociada con la memoria y la amnesia, sugirió una implementación biológica de las sinapsis de Hebb, es decir, la importancia de este modelo se determina porque se sugiere como la base de la persistencia de la memoria (Shapiro, 2001).

Estos dos tipos principales de plasticidad sináptica, LTP y LTD, pueden ocurrir en sinapsis excitadoras o inhibitorias y a través de mecanismos presinápticos y postsinápticos. La plasticidad postsináptica de las sinapsis glutamatérgicas en el hipocampo es fundamental para la memoria. La LTP o LTD inician con la activación de los receptores NMDA y, específicamente la LTD también es inducida por la activación del receptor mGluR5 en la región CA1 del hipocampo. La inducción de LTP o LTD depende de cambios en el estado de fosforilación de las subunidades del receptor del ácido propiónico α -amino-3-hidroxi-5-metil-4 isoxazol (AMPA), que determina el número de receptores AMPA expresado en las densidades postsinápticas. En general, la fosforilación promueve la inserción y estabilización de los receptores AMPA en sitios postsinápticos, mientras que la desfosforilación desencadena la internalización del receptor por endocitosis. El mantenimiento de LTP o LTD requiere una regulación dependiente de la actividad de la transcripción y la traducción local de ARNm, así como la remodelación del citoesqueleto dendrítico (Dong, et al 2015; Benarroch, 2018).

1.1.8 Recuperación de la memoria

La capacidad de recordar eventos pasados es un factor determinante en las estrategias de supervivencia en todas las especies y es de suma importancia para determinar nuestra individualidad. Es por ello que la evocación es un componente o etapa fundamental en el procesamiento de la memoria; de hecho es la única medida de memoria (Szapiro et al., 2002).

La recuperación de la memoria normalmente se interpreta como un punto final, es decir, la recuperación refleja el acceso a un rastro de memoria que ya ha sido consolidado y almacenado. Si bien esta caracterización de la recuperación como un punto final es adecuada, la recuperación también puede ser un punto de partida, esto significa que el contenido al que se accede afecta nuestras acciones y decisiones en el momento, y el acto de recuperación puede remodelar o cambiar

la prioridad del recuerdo, haciéndolo más lábil o fuerte (Fig. 8), (Kensinger & Ford, 2020)

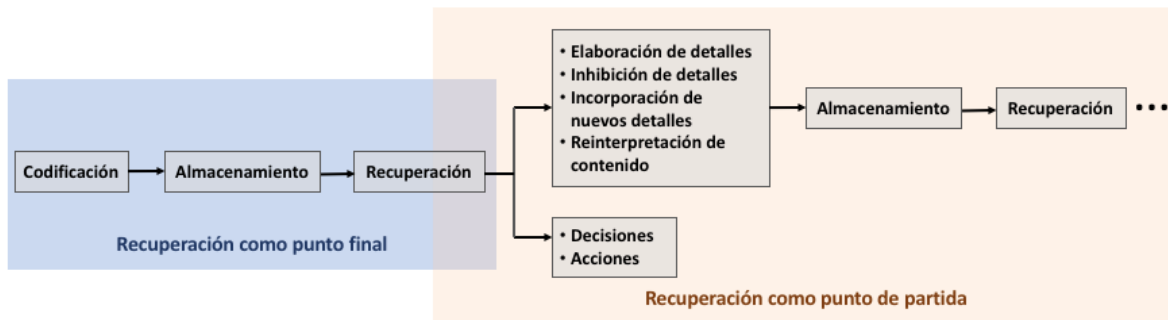


Figura 8. Recuperación de la memoria.

La recuperación de la memoria se desencadena a partir de un estímulo condicionado, un estímulo incondicionado, otros estímulos relacionados (p. ej. emocionales), otros recuerdos relacionados y, en los seres humanos, a menudo por un acto de voluntad. Es importante mencionar que la presentación de un estímulo condicionado sin reforzamiento genera extinción (Eldridge et al., 2000; Corcoran & Maren, 2001; Anderson et al., 2004)

Anteriormente se describieron los eventos moleculares que se llevan a cabo en las etapas de adquisición y consolidación de la memoria. Sin embargo, se sabe poco sobre los mecanismos moleculares involucrados en la recuperación de la memoria. Esto llama la atención ya que, en realidad la mayoría de los pacientes con déficit de memoria consultan a un médico porque no pueden recordar, no porque no puedan aprender (Szapiro et al., 2002). Sin embargo, algunos estudios sugieren que la recuperación de la memoria parece requerir la activación de los receptores de glutamato. Estudios mostraron que bloquear a receptores AMPA/kainato del hipocampo antes de probar la recuperación de la memoria, deteriora la respuesta de evitación inhibitoria (Szapiro et al., 2000) y la memoria espacial en la tarea de laberinto de agua (Riedel et al., 1999). Además, el bloqueo de los receptores metabotrópicos de glutamato (mGlu) por un antagonista general, así como la administración sistémica de un antagonista selectivo de los receptores mGluR5 antes de la prueba, impiden la recuperación de recuerdos en la prueba

de miedo condicionado (Szapiro et al., 2000; Schulz et al., 2001). Por el contrario, cuando el antagonista a NMDA se administró en el momento de entrenamiento (aprendizaje), no se modificó la recuperación de la memoria (Izquierdo & Medina, 1997; Szapiro et al., 2000; Steele & Morris, 1999). Por otro lado, las isoformas α y β 1 de la proteína cinasa C (PKC) al ser bloqueadas en la región CA1 del hipocampo dorsal 10 minutos antes de la prueba (que se realizó 24 horas después de la sesión de aprendizaje) inhibe la recuperación de memoria (Vianna et al., 2000). También se ha reportado que las vías MAPK y PKA son necesarias para la recuperación de la memoria. Esto se dedujo tras una prueba en la que se administró intrahipocampalmente PD 098059 (un inhibidor de la proteína mitógeno-activada de la cinasa 1 de la cinasa de proteína (MEK)) y Rp-cAMPs (inhibidor de la proteína cinasa A (PKA)), 10 minutos antes de la prueba (realizada 24 horas después del entrenamiento). Esta inhibición bloqueó la recuperación de la memoria en una tarea de evitación inhibitoria (Szapiro et al., 2000).

Por último se sabe que diversos sistemas, como el noradrenérgico, dopaminérgico, serotoninérgico y colinérgico, participan tanto en la formación como en la recuperación de la memoria (Quevedo et al., 2004; Cammarota et al., 2004).

1.2 5-hidroxitriptamina (5-HT o serotonina)

Desde mediados del siglo XIX, científicos habían observado que después de la formación de los coágulos sanguíneos, una sustancia en el suero resultante contraía el músculo liso vascular y aumentaba el tono vascular. A finales de siglo se identificó a las plaquetas como la fuente de esta sustancia. No fue hasta 1948 que Rapport, Green y Page aislaron e identificaron químicamente a este factor vasoconstrictor del suero como la 5-hidroxitriptamina (5-HT). Este factor tónico del suero, liberado en los sueros de las plaquetas durante la coagulación de la sangre, fue nombrado "serotonina". Las concentraciones más altas de 5-HT se encontraron en la mucosa gastrointestinal, seguidas de las plaquetas y el sistema nervioso central (SNC) (Rapport et al., 1948).

La 5-HT consiste en un grupo hidroxilo en la posición 5 del núcleo de indol y un nitrógeno de amina primaria que sirve como un aceptor de protones a pH

fisiológico hace que la 5-HT sea una sustancia hidrófila (Fig. 9). Por lo tanto, no cruza la barrera hematoencefálica que es lipofílica fácilmente. Por esta razón, su descubrimiento en el cerebro, en 1953 por Twarog y Page, sugirió que la 5-HT se sintetizaba en el cerebro (Hensler, 2012).

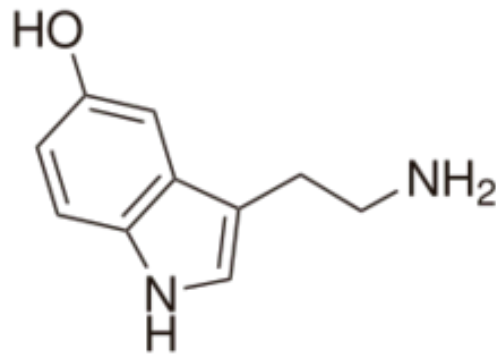


Figura 9. Estructura molecular de 5-HT.

1.2.1 Síntesis y metabolismo de la 5-HT

La 5-HT se sintetiza por una vía de dos etapas a partir del aminoácido esencial L-triptófano, que es transportado desde la sangre hacia el cerebro. El encéfalo capta activamente al triptófano por medio de un portador de aminoácidos. Las concentraciones de triptófano en el encéfalo se ven influidas no sólo por su concentración plasmática, sino también por las concentraciones plasmáticas de otros aminoácidos que compiten por el portador de captación encefálica, como la fenilalanina, leucina y metionina. Las neuronas serotoninérgicas contienen a la enzima hidroxilasa de triptófano, que es una oxidasa de función mixta que requiere oxígeno molecular y factor de pteridina reducido para entrar en actividad. Este es el paso limitante para la síntesis de 5-HT, la transformación de triptófano en 5-HTP por acción de esta enzima. En consecuencia, una reducción en la ingesta dietética de triptófano junto a un aumento de la ingesta de aminoácidos con los que compete por el transportador en el cerebro, disminuye el contenido de 5-HT en el cerebro y cambia ciertos comportamientos asociados con la función de este neurotransmisor. Esta enzima es sintetizada en los cuerpos celulares serotoninérgicos de los núcleos

del raquí y se encuentra sólo en las células que sintetizan 5-HT. Por lo tanto, su distribución en el cerebro es similar a la de la misma 5-HT. Otra enzima que participa en la síntesis de 5-HT es la descarboxilasa de aminoácidos L-aromáticos, que convierte al L-5-hidroxitriptófano en 5-HT y está ampliamente distribuida y tiene gran especificidad de sustrato. En la vía catabólica la monoamino oxidasa (MAO) convierte a la 5-HT en 5-hidroxi-indolacetaldehído, y este producto es oxidado por la enzima aldehído deshidrogenasa NAD⁺ dependiente a ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA), el cual es excretado en la orina (Fig. 10) (Hensler, 2012).

1.2.2 Localización

La 5-HT se localiza en: las plaquetas, el tracto gastrointestinal y el sistema nervioso (Berger et al., 2009; Hensler, 2012).

En el sistema nervioso, el núcleo de raquí mediano proyecta abundantemente hacia el hipocampo, el septo y el hipotálamo, mientras que el cuerpo estriado es innervado principalmente por el raquí dorsal. Los núcleos de raquí dorsal y mediano envían proyecciones neuronales a la neocórtex. La córtex frontal recibe innervación de las subregiones rostral y lateral del núcleo del raquí dorsal. Las dos vías principales serotoninérgicas ascendentes desde los núcleos del raquí del mesencéfalo hacia el prosencéfalo son la vía periventricular dorsal y la tegmentaria ventral. Ambas vías convergen en el hipotálamo caudal donde se unen al prosencéfalo (Hensler, 2012). Las neuronas 5-HT están organizadas en los nueve núcleos raquí, B1-B9. La médula espinal recibe una fuerte innervación serotoninérgica. Se han descrito tres vías descendentes principales: (1) desde el núcleo del raquí magnus (B3) hacia las láminas I y II del asta dorsal de la médula espinal; (2) desde el núcleo del raquí oscuro (B2, B4) hacia la lámina IX del cuerno ventral de la médula espinal; (3) desde la médula ventrolateral rostral y el núcleo reticular paragigantocelular lateral (B3) hacia la columna intermedio lateral de la médula espinal (Fig. 11) (Lesch & Waider, 2012).

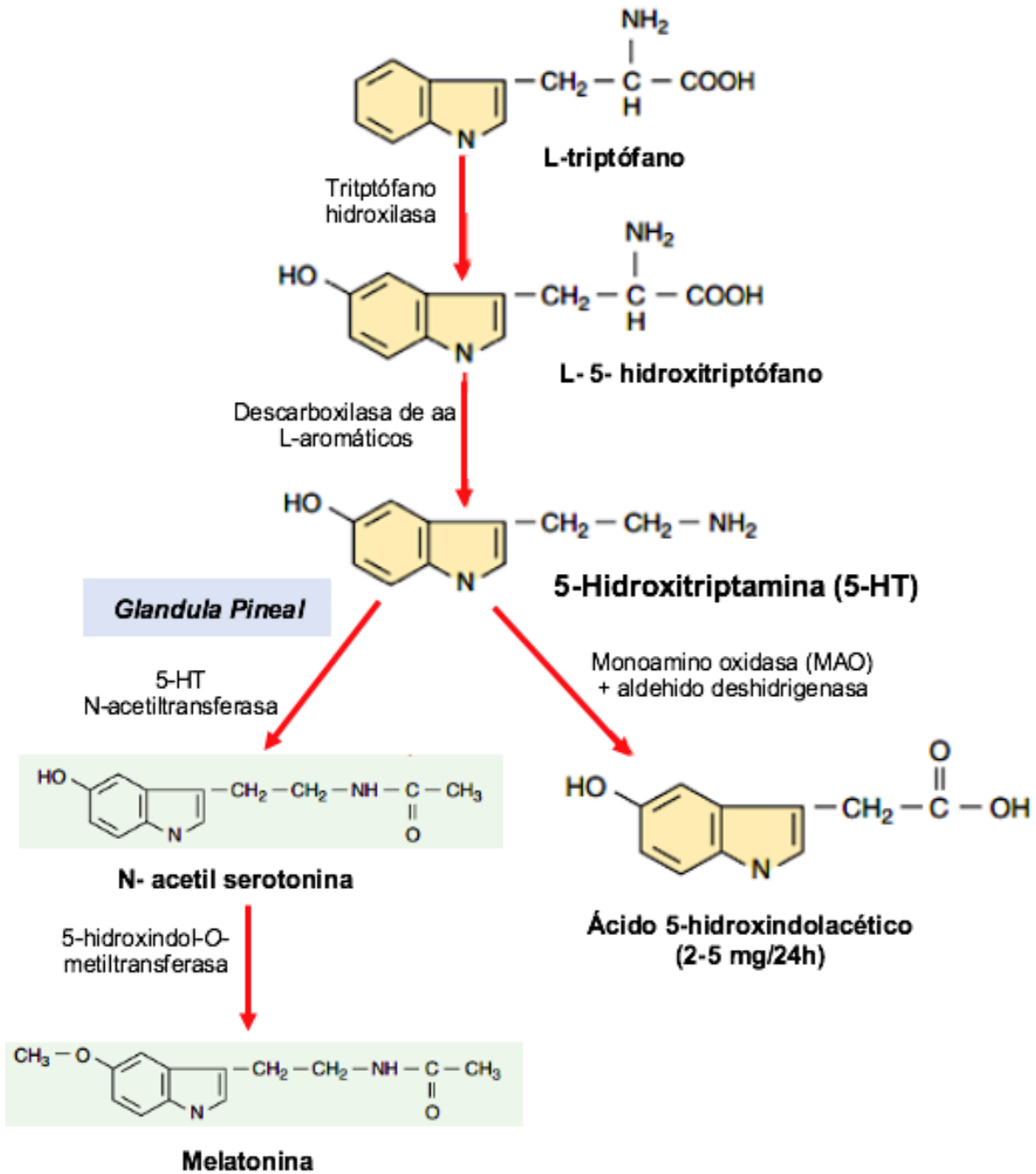


Figura 10. Síntesis y metabolismo de la 5-hidroxitriptamina. Tomado de Hansler, 2012.

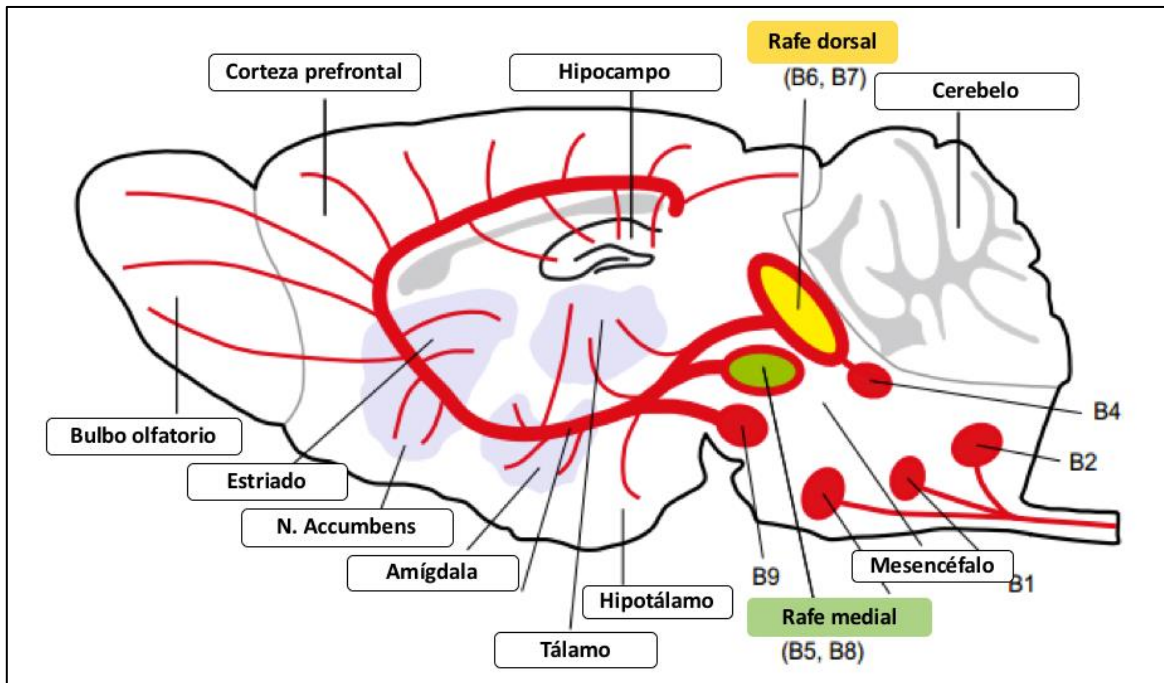


Figura 11. 5-HT en el cerebro. Tomado de Lesch & Waider, 2012

La 5-HT es quizá mejor conocida como un neurotransmisor que modula la actividad neural y una amplia gama de procesos neuropsicológicos. En el SNC desempeña un papel importante en la plasticidad neuronal (Olivier, 2015) modulando numerosos procesos fisiológicos como el sueño, el carácter, el comportamiento agresivo, la conducta sexual, los procesos sensoriales, el control cognitivo, las emociones, las respuestas autónomas y la actividad motora. Actualmente, la 5-HT está ganando importancia como uno de los blancos moleculares con aplicaciones terapéuticas, esto debido a que está involucrada en diferentes trastornos como depresión, el síndrome de Down, trastorno de estrés postraumático, esquizofrenia y ansiedad. La 5-HT también juega un papel central en el aprendizaje y la memoria; así, el estudio de la 5-HT podría permitir encontrar algún tratamiento para estos trastornos así como para alteraciones de la memoria y el aprendizaje (Hensler, 2006; Meneses & Ponce-Lopez, 2014; Volpicelli et al., 2014).

1.2.3 Clasificación de los receptores a la 5-HT

Tomando en consideración los criterios estructurales, transduccionales y operacionales, los receptores a la 5-HT se han clasificado en 7 familias: 5-HT₁-5HT₇), con por lo menos 14 subtipos de receptores (Fig. 12). A excepción de los receptores 5-HT₃, que son ionotrópicos, todas las familias de receptores 5-HT pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) (Tabla 1) (Hoyer et al., 1994; Barnes et al., 2020).

Tabla 1: Receptores a 5-HT			
Receptor	Proteína G	Vía de señalización principal	Otras vías de señalización
5-HT _{1A}	G _{i/o}	AC, PKA (-)	ERK
5-HT _{1B}	G _{i/o}	AC, PKA (-)	ERK
5-HT _{1D}	G _{i/o}	AC, PKA (-)	
5-ht _{1e}	G _{i/o}	AC, PKA (-)	
5-HT _{1F}	G _{i/o}	AC, PKA (-)	
5-HT _{2A}	G _{q/11}	PLC	ERK, PLA ₂ , PLD, Src/Akt
5-HT _{2B}	G _{q/11}	PLC	ERK, PLA ₂
5-HT _{2C}	G _{q/11}	PLC	ERK, PLA ₂ , PLD
5-HT ₃	Canal iónico	Aumenta la conductancia a Na ⁺ y K ⁺	
5-HT ₄	G _s	AC, PKA	ERK
5-HT _{5A}	G _{i/o}	AC, PKA (-)	
5-ht _{5b}	G _{i/o}	AC, PKA (-)	
5-HT ₆	G _s	AC, PKA	ERK, mTOR, Cdk5
5-HT ₇	G _s	AC, PKA	ERK

(Barnes et al., 2021).

La generación de 5-HT a partir del triptófano es una alternativa a su conversión en melatonina (en la glándula pineal), triptamina (en las neuronas) y quinurenina (en los astrocitos), que también funcionan como neuromoduladores en el cerebro. Los receptores 5-HT están localizados tanto pre- como post-

sinápticamente pero no todos los subtipos están necesariamente localizados en la misma ubicación postsináptica. Los auto-receptores inhibitorios 5-HT_{1A} y 5-HT_{1B} están localizados en cuerpos celulares y terminales de neuronas serotoninérgicas, respectivamente, y los autorreceptores 5-HT_{5A} también pueden estar presentes en los primeros. La caracterización de los receptores a la 5-HT no neuronales está lejos de ser completa. Los receptores 5-HT₃ (canales iónicos dependientes de ligando) están presentes post-sinápticamente tanto en neuronas como en células no neuronales. Los principales mecanismos de transducción se muestran a nivel postsináptico y muchos receptores convergen en vías de señalización específicas (Millan et al., 2008).

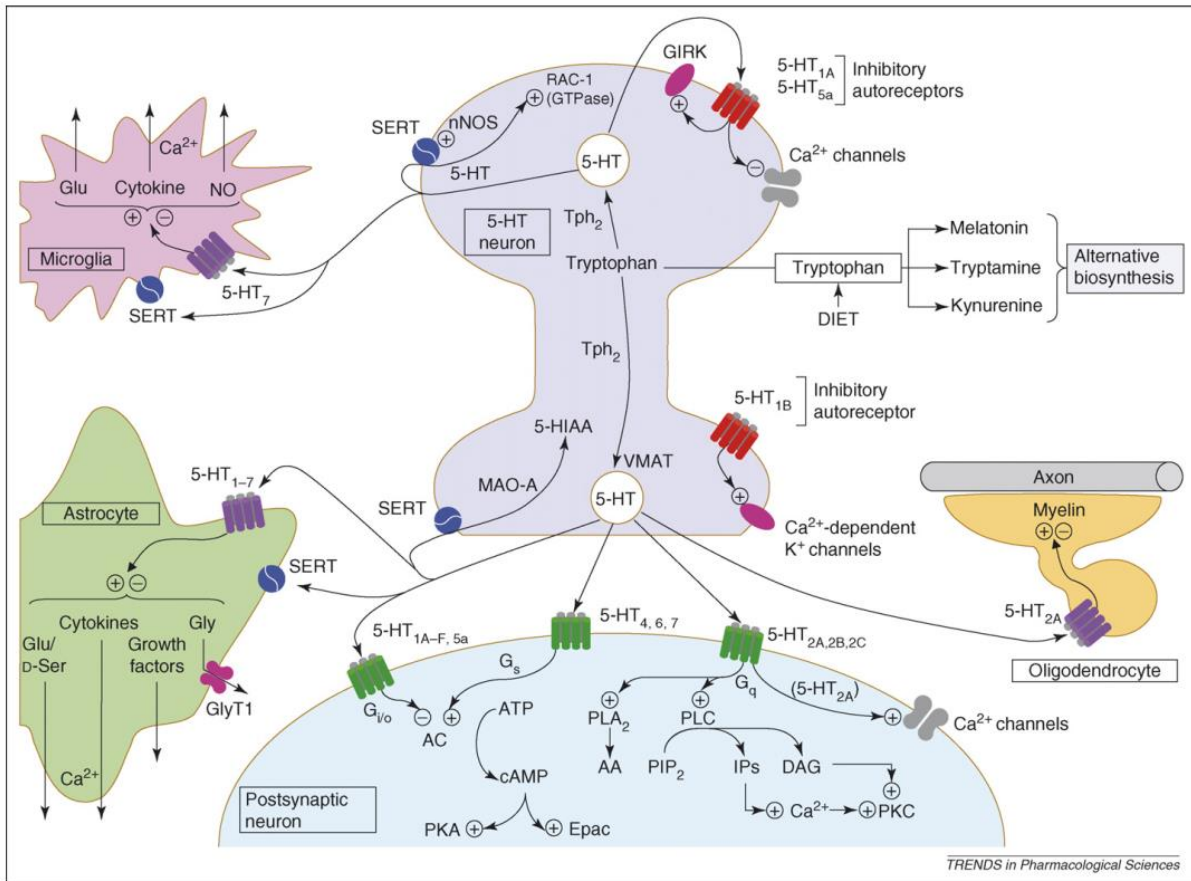


Figura 12. Vista integrada de la señalización en neuronas serotoninérgicas.
Tomado de Millan et al., 2008.

Tabla 2. Afinidad de 5-HT a sus receptores

Receptor	Especie	Valor	Parámetro
5-HT _{1A}	Hs	9.1 – 9.7	pKi
5-HT _{2A}	Hs	8.9	pKd
5-HT ₇	Rn	8.7 – 9.2	pKi
5-HT ₄	Hs	8.4 – 8.8	pKd
5-HT ₇	Mm	8.3	pKi
5-HT ₇	Hs	8.1 – 9.6	pKi
5-HT _{1B}	Mm	8.1	pKi
5-HT _{1F}	Hs	8	pKd
5-HT _{1D}	Hs	8.0 – 9.0	pKi
5-HT _{1E}	Hs	8.0 – 8.2	pKi
5-HT _{2B}	Rn	8	pKi
5-HT ₆	Rn	7.9	pKd
5-HT _{2B}	Hs	7.9 – 8.4	pKi
5-HT ₄	Rn	7.7	pKd
5-HT _{1F}	Hs	7.7 – 8.0	pKi
5-HT _{1B}	Hs	7.5 – 8.4	pKd
5-HT _{1B}	Hs	7.4 – 9.0	pKi
5-HT ₄	Mm	7.2	pKi
5-HT _{1F}	Rn	7.2	pIC50
5-HT _{2C}	Hs	6.8 – 8.6	pKi
5-HT ₆	Hs	6.8 – 7.5	pKi
5-HT ₄	Rn	6.7 – 8.2	pKi
5-HT _{2C}	Rn	6.7 – 7.9	pKi
5-HT _{5A}	Hs	6.7 – 6.9	pKi
5-HT ₆	Rn	6.6 – 7.9	pKi
5-HT _{5A}	Rn	6.6	pKi
5-HT _{2A}	Hs	6.0 – 8.4	pKi
5-HT _{5A}	Mm	6.0 – 6.6	pKi
5-HT _{2A}	Rn	6.0 – 6.5	pKi
5-HT ₄	Hs	5.9 – 7.0	pKi

*Hs: Homo sapiens; Mm: Mus musculus; Rn: Rattus norvegicus. pKi: constante de afinidad; pKd: constante de disociación; pIC50: concentración inhibitoria 50.

La tabla 2 muestra la afinidad de la 5-HT por sus diferentes receptores en tres diferentes especies. Cabe destacar la alta afinidad de la 5-HT por los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇ (Andrade et al., 2019).

1.2.4. Receptor 5-HT_{1A}

La activación de los receptores 5-HT_{1A} conduce a la hiperpolarización neuronal, un efecto mediado por las proteínas G α i/o. Las proteínas G α i/o están acopladas negativamente a la vía de señalización de la adenilato ciclasa (AC) y por lo tanto disminuyen la formación de AMPc (Fig, 13). A pesar de su alta densidad en el núcleo del rafé dorsal, los autorreceptores 5-HT_{1A} no parecen inhibir AC, sino que median la inhibición neuronal a través de diferentes vías de señalización. Los receptores 5-HT_{1A} post- y pre-sinápticos inhiben la activación neuronal tanto a través de la activación de los canales rectificadores de potasio así como a través de la inhibición de los canales de Ca²⁺, (Hensler, 2012; Stiedl et al., 2015).

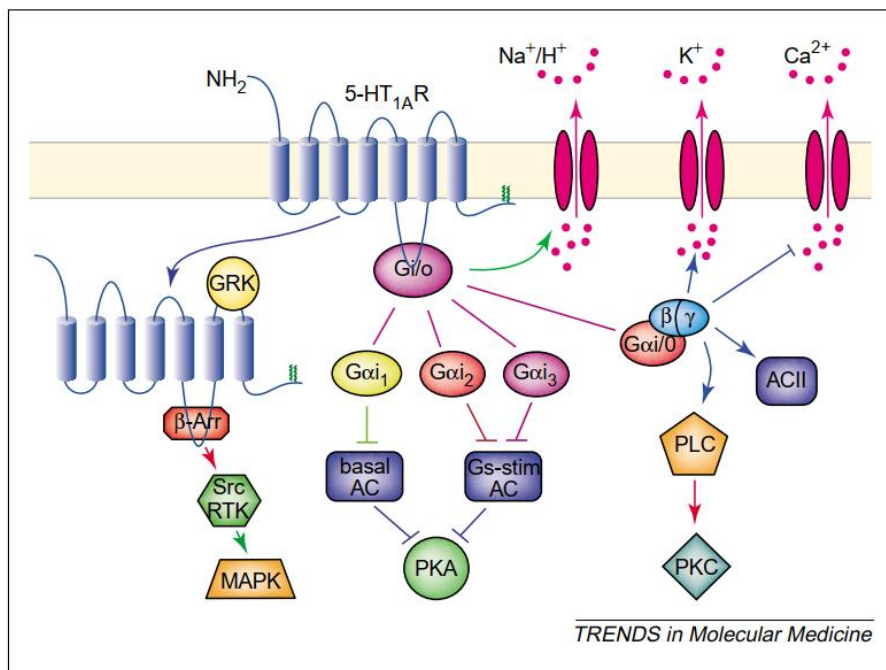


Figura 13. Vía de señalización del receptor 5-HT_{1A}. Tomado de Ritcher et al., 2003.

Borg en 2008 destacó que el receptor 5-HT_{1A} puede servir como blanco terapéutico ya que este receptor se encuentra implicado en trastornos como la ansiedad, depresión y en procesos de aprendizaje y memoria, por lo que podría ser un objetivo para su estudio y/o tratamiento (Borg, 2008).

1.2.4.1 Efecto de agonistas y antagonistas del receptor 5-HT_{1A} en la memoria

Se ha descrito que los agonistas y antagonistas del receptor 5-HT_{1A} pueden facilitar la consolidación de la memoria y/o revertir la amnesia. Estos resultados contradictorios están, en parte, relacionados con fármacos, dosis y tareas de memoria que se emplearon en los experimentos. Con la finalidad de analizar el papel de la 5-HT en diferentes formas de aprendizaje y memoria, Fernandez et al (2017) emplearon ratones con depleción constitutiva de 5-HT (ratones Pet1KO). Los ratones Pet1-KO son ratones que carecen de Pet-1 por lo que la mayoría de las neuronas de 5-HT (80%) no logran diferenciarse. Las neuronas restantes muestran una expresión deficiente de los genes necesarios para la síntesis, captación y almacenamiento de 5-HT. Pet-1 es un factor de transcripción necesario para la maduración de neuronas serotoninérgicas, y se expresa poco antes de que aparezca 5-HT en el rombencéfalo (Hendricks et al., 2003). Los ratones Pet-1KO presentaron un déficit sorprendente en la formación de memoria en la prueba de reconocimiento de objetos nuevos, una tarea dependiente del hipocampo mientras que el agonista a los receptores 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT, revirtió los déficit de memoria de los ratones Pet-1KO, estos datos sugieren la participación de la 5-HT en la formación de la memoria (Fernandez et al., 2017). En el mismo sentido, Meneses y Terrón (2001) encontraron que el 8-OH-DPAT facilitó la consolidación de la memoria en la prueba de automoldeamiento pavloviano (Meneses & Terron 2001). En línea con estos resultados, Liy-Salmeron y Meneses en 2007, reportaron que el agonista del receptor 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT bloqueó el déficit en la memoria a corto plazo inducido por ketamina, empleando la prueba de automoldeamiento pavloviano, sin tener efecto sobre la memoria a largo plazo. En el mismo estudio se encontró que el antagonista de los receptores 5-HT_{1A}, WAY 100635, mejoró la memoria a largo plazo (Liy-Salmeron & Meneses, 2007). En un estudio más,

Fernández-Pérez et al (2005) empleando la prueba de condicionamiento clásico, encontraron que la administración aguda del antagonista del receptor 5-HT_{1A}, WAY 100635 no tuvo efecto en ninguno de los parámetros de comportamiento cognitivo-conductual evaluados: precisión de respuesta, actividad de prensa de la palanca de retardo y finalización del ensayo). En el mismo estudio, la fluoxetina, un inhibidor de la recaptura de 5-HT, redujo la precisión de la respuesta dependiente del retardo en la prueba de condicionamiento clásico; de manera interesante, el pretratamiento con WAY 100635 no sólo previno este déficit por fluoxetina, sino que incluso aumentó la precisión de respuesta. Los datos sugirieron que la fluoxetina deteriora la memoria a corto plazo por una activación indirecta de los receptores 5HT_{1A}, pero de manera importante, la coadministración de fluoxetina con WAY 100635 mejoró la memoria a corto plazo, (Fernández-Pérez et al. 2005).

1.2.5 Receptor 5-HT₇

Este receptor fue clonado por primera vez en 1993 y pertenece a la familia de receptores acoplados a proteína G. Está acoplado positivamente a AC a través de las proteínas G_s, cuya activación resulta en un aumento en AMPc. Además, se ha demostrado que el receptor 5-HT₇ interactúa no sólo con G_s, sino también con la proteína G_{s12}. La palmitoilación del receptor 5-HT₇ puede ser el mecanismo molecular responsable para seleccionar entre la señalización por G_s o por G_{s12} (Fig. 14) (Guseva et al., 2014).

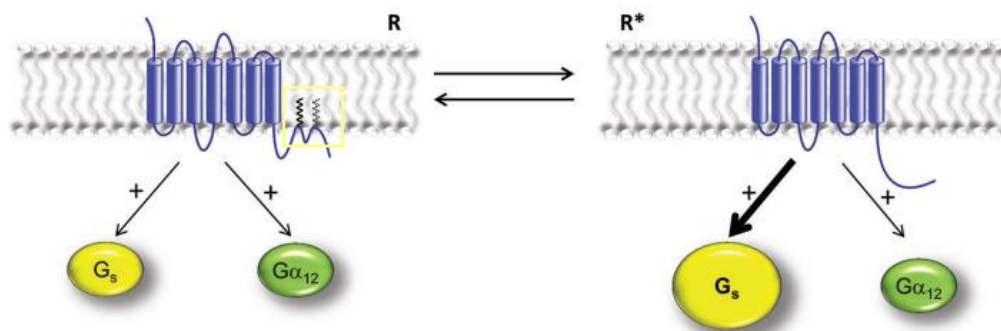


Figura 14. Regulación de la actividad del receptor 5-HT₇ por palmitoilación dinámica.

La figura 14 muestra un modelo hipotético de palmitoilación dinámica que sugiere la existencia de dos poblaciones del receptor 5-HT₇: receptores palmitoilados con dos bucles C-terminales intracelulares adicionales (izquierda) y receptores no palmitoilados sin bucles C-terminales intracelulares (derecha). Estas poblaciones existen en equilibrio dinámico regulado por el recambio de palmitato basal o promovido por agonistas. La despalmitoilación produce un aumento significativo de la capacidad del receptor para convertir de la forma inactiva (R) a la activa (R*) en ausencia de agonistas. El receptor palmitoilado muestra la activación de las proteínas G_{αs} y G_{α₁₂} (izquierda). El receptor no palmitoilado posee una actividad constitutiva (R*) independiente del agonista aumentada hacia la señalización mediada por G_{αs}, mientras que la activación mediada por el receptor de la proteína G_{α₁₂} no se altera (derecha) (Guseva et al., 2014). Esto sugiere que la palmitoilación puede representar una característica general que regula la actividad del receptor constitutivo.

La vía de señalización (Fig. 15) de los receptores 5-HT₇ es complicada y un tanto desconocida. Sin embargo, empleando herramientas farmacológicas, incluyendo antagonistas selectivos y, más recientemente, agonistas, junto con el uso de ratones knock-out para el receptor 5-HT₇, se ha revelado que este receptor está implicado en el control de la temperatura corporal, la regulación del sueño y el ciclo circadiano, así como en trastornos del estado de ánimo (depresión, esquizofrenia) y de funciones cognitivas, como el aprendizaje y memoria. Otros hallazgos preclínicos sugieren que participa en la nocicepción, epilepsia, migraña, autismo, trastornos del espectro y síndrome de Rett (Nikiforuk et al., 2015). Esto sugiere a los receptores 5-HT₇ como un blanco terapéutico potencial para el tratamiento de trastornos en el SNC. Sin embargo, aún no se ha determinado si la activación o bloqueo del receptor 5-HT₇ por algunos fármacos, se relaciona con su eficacia terapéutica mostrada en algunos desordenes del SNC.

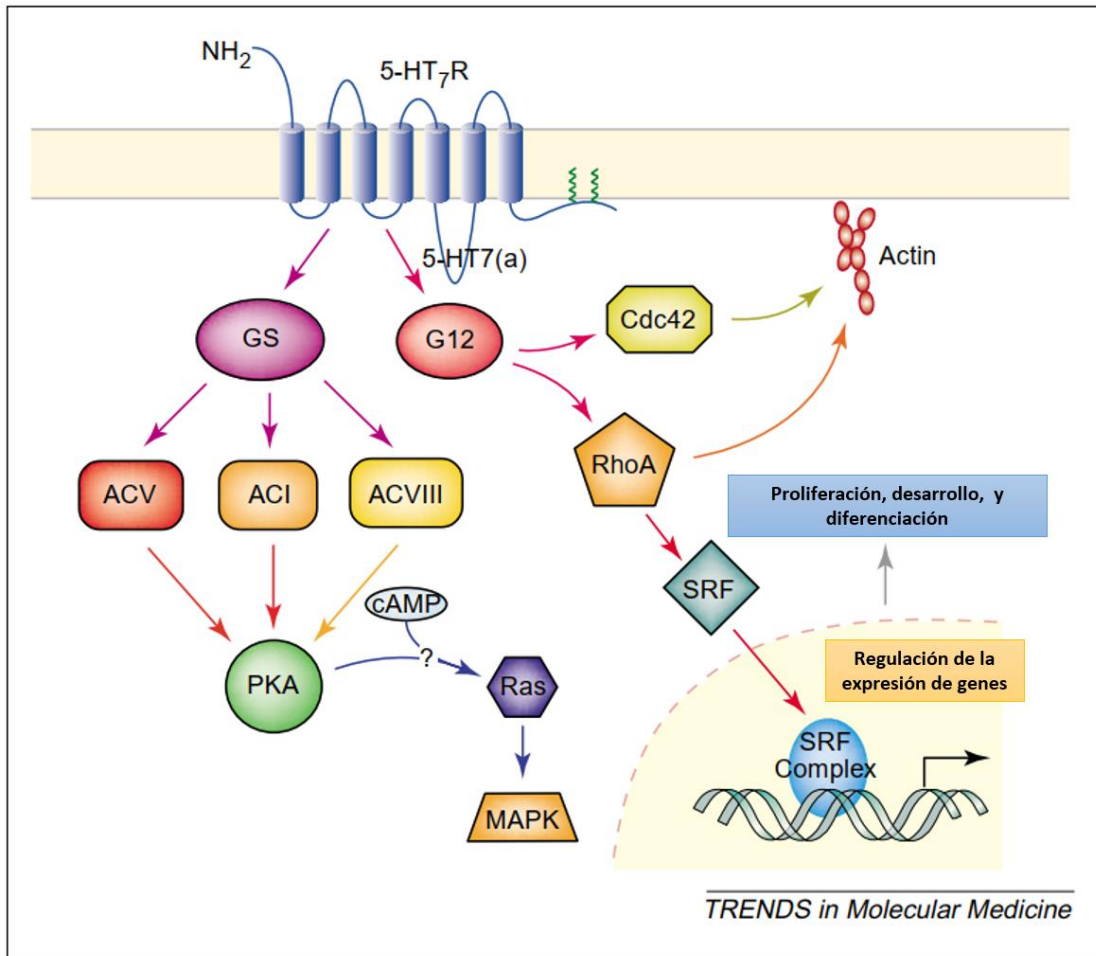


Figura 15. Vías de señalización del receptor 5-HT₇. Tomado de Ritcher et al., 2003.

1.2.5.1 Efecto de los agonistas y antagonistas del receptor 5-HT₇ en la memoria

La investigación e importancia en torno al receptor 5-HT₇ está creciendo, sin embargo, los resultados de las investigaciones son un tanto contradictorios, ya que tanto antagonistas como agonistas han demostrado tener efectos promnésicos o antiamnésicos. En este sentido se ha reportado que la activación del receptor 5-HT₇ con 5-CT (un agonista no selectivo de los receptores 5-HT₇) mejoró la memoria de reconocimiento en la tarea de reconocimiento de objetos nuevos, mientras que el bloqueo del receptor 5-HT₇, con el antagonista SB 269970, indujo un deterioro en la memoria (Freret et al., 2014). En contraste, Gasbarri et al (2008) mostraron

que el bloqueo del receptor 5-HT (con el antagonista SB 269970, mejoró la memoria de referencia de ratas en la prueba de laberinto radial de 8 brazos (Gasbarri et al., 2008). Por otro lado, los antagonistas del receptor 5-HT₇, SB 269970 y DR 4004, no tuvieron efecto sobre la memoria en una tarea de aprendizaje por automoldeamiento, sin embargo, al probarse en modelos de amnesia inducida por escopolamina o dizocilpina, los antagonistas revirtieron el efecto amnésico de las ratas (Meneses, 2004). De manera importante, se encontró que el AS 19 y el LP 211, agonistas del receptor 5-HT₇, facilitaron la consolidación de la memoria en una tarea de aprendizaje por automoldeamiento, esta mejora no se observó cuando se administró LP-211 junto con SB 269970 (Meneses, 2014).

De manera importante, Pérez-García et al (2006), reportaron que los receptores 5-HT₇ se expresan abundantemente en núcleos de rapé, hipocampo y corteza prefrontal de ratas entrenadas, con la prueba de aprendizaje por automoldeamiento, y administradas con vehículo en comparación con ratas no entrenadas. Este efecto se atenuó en presencia de AS-19, al mismo tiempo que mejoró la consolidación de la memoria, efecto que se revirtió con SB 269970. En el mismo trabajo reportaron que la estimulación farmacológica de los receptores 5-HT₇ evitó la amnesia inducida por la escopolamina o la dizocilpina (Pérez-García et al., 2006).

1.2.6 Interacción entre los receptores 5-HT_{1A} Y 5-HT₇

Se sabe que los receptores 5-HT₇ forman homodímeros y heterodímeros con el receptor 5-HT_{1A}. Para poner en contexto, la oligomerización puede ocurrir entre protómeros (unidad estructural de una proteína oligomérica) de receptores idénticos (homodimerización) o entre receptores diferentes que pertenecen a la misma o diferente familia GPCR (heterodimerización). La heterodimerización puede dar como resultado un cambio en la farmacología del receptor, ya sea al afectar la unión del ligando a monómeros individuales o al formar nuevos sitios de unión (Naumenko et al., 2014).

La heterodimerización 5-HT₇-5-HT_{1A} disminuye la activación mediada por el receptor 5-HT_{1A} de la proteína Gi sin afectar la señalización mediada por el receptor

5-HT₇. Además, la heterodimerización disminuye notablemente la capacidad del receptor 5-HT_{1A} de activar los canales rectificadores de potasio (GIRK o Kir3) dependientes de la proteína G, en un sistema heterólogo (que contiene proteínas diferentes al del portador original). La heterodimerización está implicada de manera crucial en la iniciación de la internalización del receptor 5-HT_{1A} mediada por la 5-HT y también mejora la capacidad del receptor 5-HT_{1A} para activar las proteínas cinasas activadas por mitógeno. Finalmente, la producción de receptores 5-HT₇ en el hipocampo disminuye continuamente durante el desarrollo postnatal, lo que indica que la concentración relativa de los heterodímeros 5-HT_{1A}-5-HT₇ y, en consecuencia, su importancia funcional, experimenta importantes cambios durante el desarrollo, (Renner et al., 2012).

Hay una serie de estudios que sugieren una comunicación cruzada funcional entre los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇ en diversos procesos fisiológicos.

En un estudio de termorregulación, se demostró la participación de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇ mediante la administración del agonista 8-OH-DPAT. Este agonista de los receptores 5-HT_{1A} en dosis de 0.3-0.6 mg/kg, i.p. disminuyó la temperatura corporal de ratones en ratones 5-HT₇^{+/+} pero no en ratones 5-HT₇^{-/-}, mientras que a una dosis más alta (1 mg/kg, i.p.), el 8-OH-DPAT indujo hipotermia en ratones 5-HT₇^{-/-} y 5-HT₇^{+/+}. También reportaron que el tratamiento previo de ratones con el antagonista selectivo del receptor 5-HT_{1A}, WAY 100135, bloqueaba completamente la respuesta hipotérmica de 8-OH-DPAT en ratones 5-HT₇^{+/+} (Hedlund et al., 2004; Naumenko et al., 2014). En línea con estos resultados, se ha reportado que los receptores 5-HT₇ centrales son los que tienen implicación en la respuesta hipotérmica en ratones. Esto se demostró con la administración intracerebroventricular del agonista selectivo del receptor 5-HT₇, LP 44. En el mismo estudio, la comparación de la hipotermia inducida por el receptor 5-HT₇ y 5-HT_{1A} en ocho cepas de ratones no reveló ninguna correlación, lo que sugiere la baja interacción funcional entre los receptores 5-HT₇ y 5-HT_{1A} en el control de la temperatura corporal; resultado que sugirió que los receptores centrales 5-HT₇ y 5-HT_{1A} pueden estar involucrados independientemente en la termorregulación (Naumenko et al., 2011).

El efecto antidepresivo de los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) depende en parte de las funciones del autorreceptor 5-HT_{1A}, por lo que el tratamiento crónico con ISRS se asocia con una recuperación progresiva de la tasa de activación de las neuronas 5-HT, correlacionando con la mejoría clínica de la depresión. Esto es, los niveles elevados de autorreceptor 5-HT_{1A}, o la disminución del número de neuronas 5-HT mediada en parte por autorreceptores, tienden a reducir la neurotransmisión de 5-HT y la depresión parece deberse a una disminución en la actividad serotoninérgica (Albert & Lemonde, 2004).

Esto no descarta que los receptores 5-HT₇ también puedan estar involucrados en los efectos terapéuticos de los antidepresivos. Por ejemplo, tanto los antidepresivos tricíclicos como los ISRS indujeron la activación del receptor 5-HT₇ dentro del núcleo supraquiasmático y la expresión de c-Fos en neuronas serotoninérgicas de ratas con. Además, el tratamiento crónico con antidepresivos condujo a una disminución de la unión al receptor 5-HT₇. Estos datos sugieren que los receptores 5-HT₇ y 5-HT_{1A} pueden estar involucrados en la acción del fármaco antidepresivo (Naumenko et al., 2014).

En otro estudio reportaron que la administración de fluoxetina (ISRS), no tiene ningún efecto sobre la memoria emocional, que fue evaluada en una prueba motivada por el miedo que se usa clásicamente evaluar la memoria a corto o largo plazo: la prueba de evitación pasiva. Sin embargo, cuando se combinó fluoxetina con el antagonista de receptores 5-HT_{1A}, NAD-299, se produjo una facilitación de la formación de memoria, efecto que fue bloqueado por el antagonista selectivo de los receptores 5-HT₇ SB269970. Estos hallazgos sugieren que el bloqueo de los receptores 5-HT_{1A} mejora la formación de la memoria, mientras que el bloqueo de los receptores 5-HT₇ no tiene efecto (Eriksson et al., 2012).

Aún no es claro cuál es el mecanismo por el cual la heterodimerización de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇ pudiera intervenir en los efectos de los tratamientos previamente mencionados. Haciendo especial énfasis en los procesos de memoria, no es claro el porqué los agonistas y antagonistas específicos de receptores a 5-HT tienen efectos promemoria, antiamnésicos o ninguno. Ante esta paradoja, es importante profundizar el análisis de la función de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇

Para estudiar a los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇ y su participación en la memoria se sugirió un modelo de recuperación de memoria, ya que uno de los aspectos importantes en la formación de recuerdos (memoria) es la capacidad de recuperar esa información. Es importante mencionar que tanto la incapacidad de evocar recuerdos como la constancia en mantener un mismo recuerdo presente (hipermemoria) están asociadas a trastornos psicológicos.

1.4 El enriquecimiento ambiental (EAM).

El Enriquecimiento ambiental (EAM) es un entorno experimental complejo donde los animales se alojan en jaulas grandes que contienen túneles, ruedas de ejercicio voluntario, plataformas y juguetes de diferente forma, textura, tamaño y colores, que se cambian con frecuencia para estimular la curiosidad y la exploración de los animales hacia ellos (Fig.16). De manera sobresaliente se sabe que el EAM produce cambios celulares y moleculares en el cerebro asociados con una mejora en el aprendizaje y la memoria. A nivel de comportamiento, el enriquecimiento ambiental mejora el aprendizaje y la memoria, reduce la pérdida de memoria en animales de edad avanzada, disminuye la ansiedad y aumenta la actividad exploratoria. De manera fisiológica, el EAM está relacionado con efectos celulares en la plasticidad sináptica y neurogénesis en el giro dentado del hipocampo, lo que indica que las neuronas nuevas pueden tener un papel funcional en la mejora en el aprendizaje y memoria (Laviola et al., 2008; Nithianantharajah & Hannan, 2006; Patel, 2012; Segovia et al., 2006; van Praag, 2000).

En la literatura se ha reportado que la administración de bupiróna 0.1 mg/kg, un agonista del receptor 5-HT_{1A}, junto con el enriquecimiento ambiental mejoró la adquisición de aprendizaje espacial y la retención de memoria, al mismo tiempo que atenúa el daño histológico de ratas macho de 17 días de edad postnatal a las que les fue realizada una lesión cerebral traumática (TBI), lo que sugiere que el efecto es aditivo (Monaco et al., 2014).

Con estos antecedentes, se considera que el enriquecimiento ambiental pudiera tener un efecto coadyuvante en la recuperación de la memoria. Por último, para explorar los mecanismos moleculares que pudieran estar involucrados en la

recuperación de la memoria, emplearemos la tecnología de microarreglos para determinar la actividad transcripcional de todos los genes, en una condición determinada (máxima retención y recuperación de la memoria).

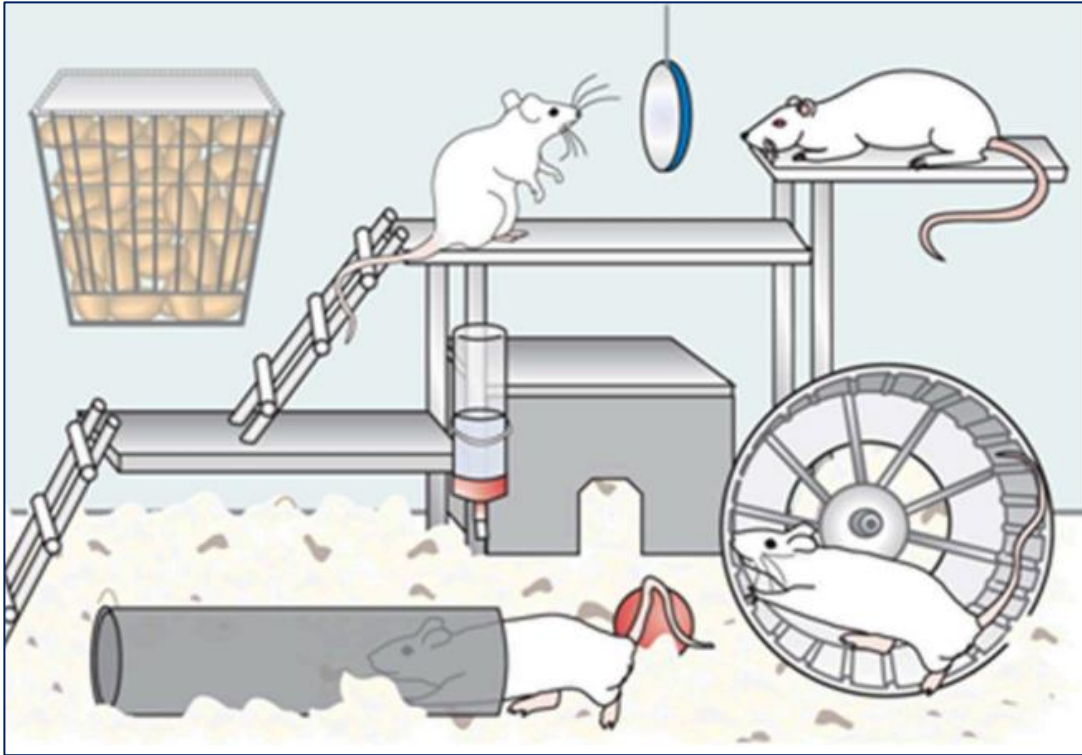


Figura 16. Enriquecimiento ambiental.

1.5 Los microarreglos de ADN

La tecnología de microarreglos de ADN permite explorar algunos mecanismos moleculares que subyacen al aprendizaje y la memoria. En este sentido, en la literatura encontramos reportado los perfiles de expresión génica de 12 subtipos de receptores de 5-HT en dos diferentes tareas: laberinto de agua y condicionamiento de evitación pasiva. Al menos tres receptores de 5-HT mostraron cambios significativos en la expresión génica cuando se compararon animales control y los animales entrenados en laberintos de agua: Htr2c, Htr3a y Htr6, genes de los receptores 5-HT_{2C}, 5-HT_{3A} y 5-HT₆, respectivamente. La expresión de Htr2c (gen del receptor 5-HT_{2c}) se redujo una hora después del entreamiento, mientras que presentó un aumento cuando se evaluó después de 24 h. por otro lado, el

ARNm de Htr3a (gen del receptor 5-HT_{3A}) aumentó a las 24 h, mientras que el Htr6 disminuyó a las 6 h posteriores al entrenamiento. Durante el condicionamiento de evitación pasiva, la expresión de Htr3a aumentó, mientras que la de Htr1b y Htr4, genes de los receptores 5-HT_{1B} y 5-HT₄, respectivamente, disminuyó cuando se compararon con el grupo naive (Cavallaro, 2008)

Sin embargo, no se encuentra reportada la expresión génica de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇ en la tarea de automoldeamiento pavloviano.

2. Justificación

Diversos trastornos en el sistema nervioso central (SNC), incluyendo la enfermedad de Alzheimer y el estrés post-traumático, se asocian con alteraciones en la memoria, los cuales, a la fecha carecen de un tratamiento efectivo.

Existe evidencia de que los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇ participan en los procesos de memoria. Sin embargo, se desconoce el papel de agonistas y antagonistas de estos receptores en el proceso de recuperación de la memoria, un mecanismo poco explorado.

Así mismo, se ha demostrado que el enriquecimiento ambiental (EAM) revierte algunos deterioros de la memoria; por lo tanto, en este trabajo se estudiará al EAM como un agente coadyuvante para facilitar la recuperación de la memoria.

El análisis de microarreglos de ADN nos permite identificar la expresión génica de receptores. En este proyecto, detectaremos la presencia de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇ en procesos de formación y recuperación de memoria, así como de las vías de señalización que se ven modificadas en estas condiciones.

3. Hipótesis

3.1. La administración de L-triptófano, precursor de la 5-HT, mejorará la recuperación de la memoria a largo plazo.

3.2 La estimulación de los receptores 5-HT_{1A} y el bloqueo de los receptores 5-HT₇ facilitará la recuperación de la memoria.

3.3. El enriquecimiento ambiental mejorará la formación y recuperación la memoria.

3.4. El enriquecimiento ambiental tendrá un efecto coadyuvante en la recuperación de la memoria cuando se combina con un agonista de los receptores 5-HT_{1A}.

3.5 Los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇ se encontrarán expresados a la alta y a la baja, respectivamente, en el grupo que mejoró la recuperación de la memoria (con la técnica de microarreglos de ADN).

4. Objetivo General

Determinar el papel de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇ y del enriquecimiento ambiental sobre la recuperación de la memoria.

4.1 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de la 5-HT mediante la administración triptófano, precursor de la síntesis de 5-HT, en la recuperación de la memoria.
2. Estudiar el efecto de la administración sistémica de un agonista y un antagonista: 1) de los receptores 5-HT_{1A} y 2) de los receptores 5-HT₇ en la recuperación de la memoria.
3. Estudiar el efecto de la coadministración sistémica de un agonista y un antagonista: 1) de los receptores 5-HT_{1A} y 2) de los receptores 5-HT₇ en la recuperación de la memoria.
4. Estudiar el efecto de la interacción, por medio de co-administraciones, del agonista y el antagonista del receptor 5-HT_{1A} con el agonista y el antagonista del receptor 5-HT₇.
5. Evaluar el efecto de la administración intrahipocampal de un agonista y un antagonista: 1) de los receptores 5-HT_{1A} y 2) de los receptores 5-HT₇ en la recuperación de la memoria.
6. Determinar el efecto del enriquecimiento ambiental: 1) previo y durante el protocolo de experimentación, 2) durante el periodo de interrupción en el protocolo de recuperación de memoria, y 3) cuando se combina con un agonista de los receptores a 5-HT_{1A}.
7. Realizar el análisis de microarreglos comparando 1) máxima retención (48h) vs pérdida de memoria (216h) y 2) pérdida de memoria (216h) vs recuperación de memoria (216h).

5. Materiales y métodos

5.1 Animales

Los animales se obtuvieron del bioterio del Departamento de Farmacobiología, Cinvestav. Se emplearon ratas Wistar macho de 250 a 300 g de peso y 12 semanas de edad. Los animales fueron alojados a temperatura ambiente (22 ± 1 °C), con ciclo de luz controlado 12:12 h (iniciando a las 7:00 am) y con acceso a agua y alimento ad libitum. Después de una semana de habituación al ambiente, el peso de las ratas se redujo gradualmente hasta el 85% de su peso inicial (disminución del 15%) mediante el control de alimento por día durante siete días. Al término de cada experimento los animales tuvieron 30 min de acceso libre a comida. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL, Proyecto No. 047/02) y se siguieron las medidas establecidas por la Norma Oficial Mexicana para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM -062-ZOO-1999) de conformidad con la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud (National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals., 2011). Es importante destacar que cada animal fue asignado solo a un grupo específico y que se emplearon grupos independientes (de 6 a 13 animales) para cada experimento.

5.2 Prueba de aprendizaje por automoldeamiento

La tarea de aprendizaje por automoldeamiento combina el condicionamiento clásico e instrumental (es decir, estímulo-estímulo y estímulo-respuesta condicionada). Es importante mencionar que los recuerdos de larga duración se forman de manera más eficiente después de varias sesiones de entrenamiento separadas por intervalos adecuadamente y temporizados, el automoldeamiento cumple este criterio (Meneses & Tellez, 2014).

El automoldeamiento Pavloviano/Instrumental representa una tarea de aprendizaje casi completamente automatizada, reduciendo así considerablemente la intervención humana. Las características principales de este modelo son: 1) detecta pequeños cambios (aumento o disminución) en diversos parámetros de

comportamiento no redundantes (es decir, no mide el mismo evento), 2) la respuesta condicionada emerge rápidamente y mejor aprendida cuando hay un tiempo entre ensayos, 3) el automoldeamiento Pavloviano/instrumental separa los entrenamientos de las sesiones de prueba y 4) se ha demostrado que ha sido útil para detectar cambios en la formación de la memoria provocados por fármacos o el envejecimiento (Meneses, 2003).

5.2.1 Aparato

La cámara de automoldeamiento (Coulbourn Instruments, Lehigh Valley, PA, USA) tiene las siguientes dimensiones: 25 cm de ancho, 29 cm de largo y 29 cm de alto. El nose-poke iluminable se encuentra a 4 cm del piso, usado como estímulo condicionado (EC). Para el estímulo incondicionado (EI), pellets de comida fueron colocados dentro de un comedero ubicado a 5 cm a la derecha del nose-poke y 3 cm por encima del suelo.

5.2.2 Habitación

La habituación consistió en que cada animal fue colocado dentro de la cámara experimental y tuvo acceso libre a 50 pellets de comida (45 mg c/u), previamente colocados dentro del comedero. El programa de automoldeamiento iniciaba una vez que el animal comía todo el alimento y presentaba 150 nose-pokes (medidos por una fotocelda) en el comedero.

5.2.3 Automoldeamiento

El entrenamiento consistió en ensayos discretos. Un ensayo se compone de presentaciones estímulo condicionado (nose-poke) – estímulo incondicionado (entrega de alimento) [EC-EI] e involucra la iluminación del nose-poke [EC] durante 8 segundos seguido de la entrega de un pellet de alimento [EI] (emparejamiento pavloviano estímulo-estímulo [E-E]) seguido por un tiempo-entre-ensayo (TEE) de 60 seg. Cuando el animal intrduce su nariz en el EC, se apaga la luz y se entrega inmediatamente un pellet de comida (EI) (emparejamiento secuencial instrumental respuesta-estímulo [R-S]), luego se inicia el TEE. La respuesta durante la EC es una

respuesta condicionada (RC), el aumento o disminución de la RC se consideró como una mejora o deterioro de la memoria (índice de memoria), respectivamente. Si el animal no presenta la RC, el EC tiene una duración de 8 s, y al final de este período, el EI se entrega. Por lo tanto, el animal se expone tanto al condicionamiento Pavloviano como al instrumental. La sesión de entrenamiento- automoldeamiento consistió en 10 ensayos y las sesiones de prueba consistieron en 20 ensayos. El programa de automoldeamiento reporta cada nose-pok como un porcentaje del total de ensayos y esos datos son considerados como datos crudos. Los animales fueron evaluados a las 1.5, 24, 48 y finalmente a las 216 h. Al periodo que transcurrió entre las 48 h y las 216 h se llamó “periodo de interrupción”, ya que no hubieron sesiones de automoldeamiento (Fig. 17) (Meneses, 2003).

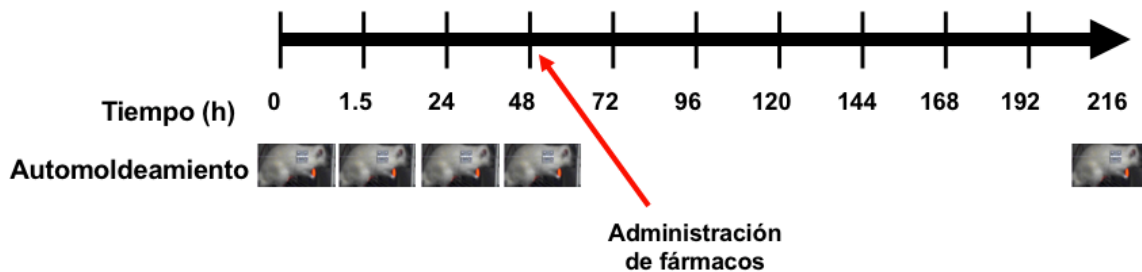


Figura 17. Protocolo experimental.

El periodo de interrupción estuvo basado en experimentos previamente reportados (Tellez et al., 2012). Los autores describieron que las ratas disminuyeron el %RC después de siete días de interrupción. Esta disminución fue llamada decaimiento de la memoria.

En nuestro protocolo experimental, los niveles individuales de %RC a las 48 h fueron considerados como “máxima retención” de cada rata y representan una medida de memoria. Una disminución en el %RC fue interpretado como decaimiento de la memoria, mientras que si el %RC no cambiaba o se incrementaba, se interpretaba como una mejora en la recuperación de la memoria. Sólo se incluyeron animales que presentaban un rendimiento progresivo y presentaban respuestas condicionadas en dos sesiones consecutivas. Ciertamente, aunque en las figuras no se muestra una media de error estándar (MEE) de retención máxima (barra

izquierda), los datos brutos de cada rata se sometieron al análisis estadístico y luego se normalizaron. Para evitar cualquier otra interferencia en la formación de la memoria, los animales no recibieron ninguna manipulación adicional. Alrededor del 70-80% de los animales probados cumplieron los criterios de rendimiento progresivo. Se reportaron los parámetros de conducta en la que una disminución del número de %RC se consideró deterioro de la memoria, mientras que si el %RC no cambiaba o aumentaba se interpretó como una mejora o refuerzo en la recuperación de la memoria.

5.3 Administración de fármacos

Todos los fármacos fueron administrados sistémicamente inmediatamente después de la cuarta sesión de automoldeamiento (Fig 18). Finalmente, empezó el periodo de interrupción (sin sesiones de automoldeamiento durante 168 h). Los fármacos que fueron estudiados fueron: L-triptófano, 8-OH-DPAT (agonista del receptor 5-HT_{1A}), WAY 100635 (antagonista del receptor 5-HT_{1A}), LP 211 (agonista del receptor 5-HT₇), SB 269970 (antagonista del receptor 5-HT₇) y LY 215840 (antagonista de los receptores 5-HT₂ y 5-HT₇).

5.3.1 Receptor 5-HT_{1A}

Después de la sesión de las 48 h, se administró el agonista del receptor 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT (0.031 o 0.062 mg/kg) o el antagonista selectivo del receptor 5-HT_{1A}, WAY 100635 (0.3 o 0.6 mg/kg) a grupos independientes. Otros dos grupos recibieron: (1) WAY 100635 (0.3 mg/kg) y 5 minutos después 8-OH-DPAT (0.031 mg/kg); o (2) WAY 100635 (0.6 mg/kg) y 5 minutos después 8-OH-DPAT (0.062 mg/kg). Todos los grupos fueron evaluados 168 h más tarde.

5.3.2 Receptor 5-HT₇

Una vez finalizada la sesión de 48 h, se administraron: 1) el agonista del receptor 5-HT₇, LP 211 (0.5, 1.0, 2.5, 5.0 o 10.0 mg/kg; 2) el antagonista del receptor 5-HT₇, SB 269970 (1.0 o 10.0 mg/kg) o, 3) el antagonista no selectivo a 5-HT_{7/2A}, LY 215840 (1.0 o 20.0 mg/kg) a grupos independientes. Adicionalmente, seis grupos

recibieron la administración de alguna de las siguientes combinaciones: (1) SB 269970 (1.0 mg/kg) + LP 211 (1.0 mg / kg); (2) SB 269970 (1,0 mg/kg) + LP 211 (0,5 mg/kg); (3) SB 269970 (10.0 mg/kg) + LP 211 (2.5 mg/kg); o (4) SB 269970 (10.0 mg/kg) + LP 211 (10.0 mg/kg), (5) LY 215840 (1.0 mg/kg) + LP 211 (0.5 mg/kg) y (6) LY 215840 (20.0 mg/kg) + LP 211 (10.0 mg/kg). El segundo fármaco se administró 5 minutos después de la primera administración y todos los grupos se evaluaron después del período de interrupción (168 h).

5.3.3 Interacción de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇

Con la finalidad de estudiar el efecto de la interacción entre ambos receptores, se incluyeron seis grupos independientes de animales. Después de la sesión de 48 h, los animales recibieron por vía intraperitoneal uno de los siguientes tratamientos: (1) 8-OH-DPAT (0.031 mg/kg) + LP 211 (10.0 mg/kg); (2) 8-OH-DPAT (0,031 mg/kg) + SB 269970 (1.0 mg/kg); (3) WAY 100635 (0.6 mg/kg) + LP 211 (10.0 mg/g); (4) WAY 100635 (0.6 mg/kg) + SB 269970 (10.0 mg/kg); (5) SB 269970 (1 mg/kg) + WAY 100635 (0.3 mg/kg) + LP 211 (5.0 mg/kg); y (6) SB 269970 (1 mg/kg) + WAY 100635 (0.3 mg/kg) + 8-OH-DPAT (0.031 mg/kg). El tiempo entre administración de cada fármaco fue de 5 min. Finalmente, todos los animales fueron probados 168 h más tarde.

5.4 Fármacos

- ✓ L-Triptófano: Ácido 2-amino-3-(1H-indol-3-il) propanoico (Khaliq et al., 2006; Sharp et al., 1992), fue administrado por vía subcutánea.
- ✓ 8-OH-DPAT: 8-hidroxi-2- (di-n-propilamino) tetralina, agonista del receptor 5-HT_{1A}, se administró por vía intraperitoneal (Liy-Salmeron & Meneses, 2007; Perez-García & Meneses, 2008).
- ✓ WAY 100635: Trihidrocloruro de N- [2-[4-(2-metoxifenil)-1- piperazinil] etil]-N-(2-piridinil) ciclohexanencarboxamida, antagonista de los receptores 5-HT_{1A}. Se administró por vía intraperitoneal (Liy-Salmeron y Meneses, 2007; Pérez-García et al., 2006).

- ✓ LP 211: N-(4-cianofenilmetil)-4-(2-difenil)-1-piperazinehexanamida, agonista del receptor 5-HT₇ fue administrado por vía subcutánea. Este fármaco fue donado por el Prof. Marcelo Leopoldo (Bari, Italy) (Adriani et al., 2012);
- ✓ SB 269970: (2R)-1-[(3-hidroxifenil) sulfonil]-2-[2-(4-metil-1-piperidinil) etil] piroldine, antagonista del receptor 5-HT₇, es administró por vía intraperitoneal (Freret et al., 2014; Meneses, 2004; Perez-García & Meneses, 2008).
- ✓ LY 215840: (6aR,9R,10aR)-N-((1S,2R)-2-hidroxiciclopentil)-4-isopropil-7-metil-4,6,6a,7,8,9,10,10a-octahidroindolo[4,3-fg]quinoline-9-carboxamida, antagonista de los receptores 5-HT_{2A/7}, se administró por vía intraperitoneal (Meneses, 2002).

Todas las dosis utilizadas fueron obtenidas de trabajos previos. A excepción del LP 211, todos los demás compuestos utilizados se adquirieron en Tocris Bioscience Ltd. (Ellisville, MO, EE. UU.). El L-triptófano se preparó en agua tibia y el LP 211 en etanol al 10%. Todos los demás compuestos se prepararon en solución salina. Los animales recibieron una sola administración (1 ml/kg) después de la cuarta sesión de automoldeamiento. La Tabla 3 muestra las afinidades de los compuestos por los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇.

Tabla 3. Afinidades			
Fármaco	pki		Referencias
	5-HT_{1A}	5-HT₇	
8-OH-DPAT	8.7	7.5	(Hoyer et al., 1994)
WAY 100635	10	-	(Hoyer et al., 1994)
LP 211	6.7 (rata)	9.2 (rata)	(Hedlund et al., 2010)
	6.4 (humano)	7.8 (humano)	
SB 269970	<5	8.9	(Hagan et al., 2000)
LY 215840	-	7.83 (humano)	(Cushing et al., 1996)

5.5 Administración intrahipocampal: cirugía estereotáxica

El vehículo y los fármacos fueron administrados por medio de cánulas guía implantadas en la región CA1 del hipocampo (administración bilateral). Las ratas fueron anestesiadas con ketamina (70 mg/kg i.p.) y xilazina (7 mg/kg, i.p.);

posteriormente el animal fue colocado en el aparato estereotáxico y se inició la cirugía. La cirugía estereotáxica consistió en hacer una incisión en la piel de la cabeza de aproximadamente 2 cm, una vez expuesto el cráneo se localiza la Bregma (unión entre la sutura sagital y la sutura frontoparietal, y que se considera como coordenada base) a partir de la cual se ubican las siguientes coordenadas que corresponden a la región CA1 del hipocampo (Figs. 18 y 19) (Paxinos & Watson, 2013):

Lateral izquierda: Coordenada base + 4.0

Antero posterior: Coordenada base - 3.6

Lateral derecho: Coordenada base -2.0

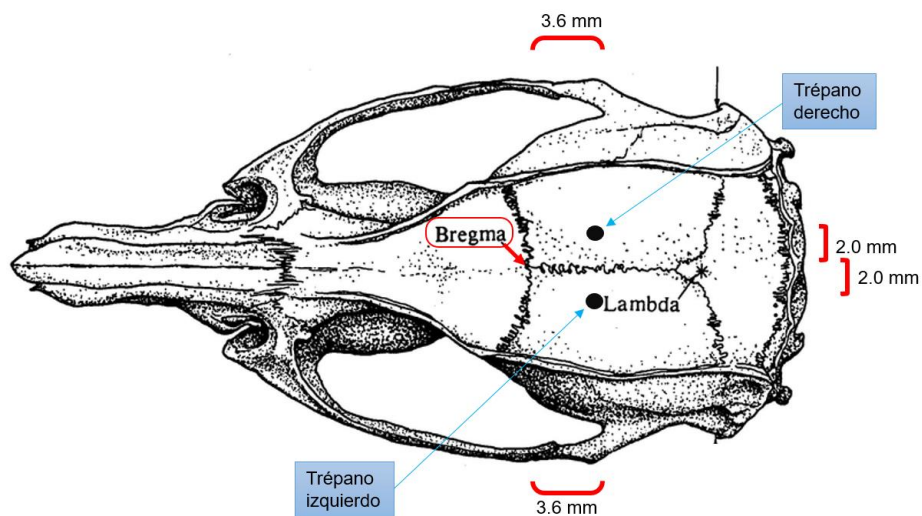


Figura 18. Coordenadas del área de administración bilateral.

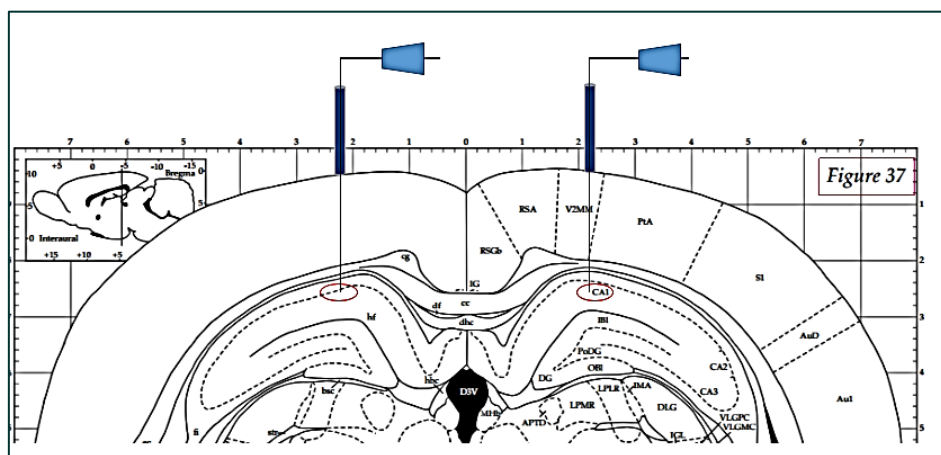


Figura 19. Región CA1 del hipocampo, área de administración.

Una vez que se localizó el hipocampo se implantaron las cánulas con la ayuda de una fresadora. Las cánulas se fijaron de manera permanente con 2 tornillos de acero inoxidable y cemento acrílico dental. Los animales tuvieron una semana de recuperación en camas individuales antes de iniciar el protocolo experimental. La administración de los fármacos se realizó a una velocidad de 0.6 $\mu\text{l}/\text{min}$. Una vez realizada la cirugía, los animales se recuperaron por siete días en camas individuales. El protocolo experimental que se siguió se muestra en la figura 20.

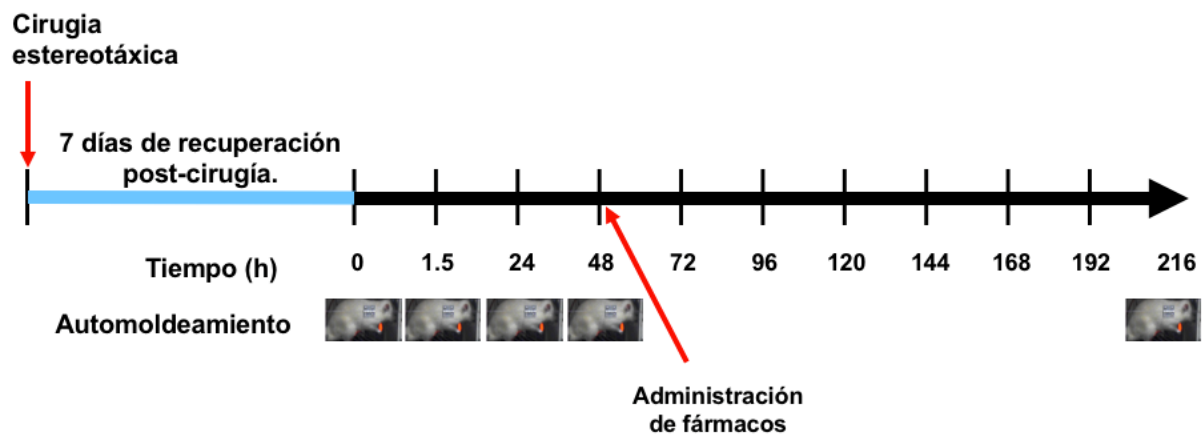


Figura 20. Protocolo experimental de la administración intrahipocampal.

5.6 Enriquecimiento ambiental (EAM)

El enriquecimiento ambiental (EAM) en animales de laboratorio se refiere a condiciones de alojamiento óptimas, ya sea jaulas o cámaras de exploración, que facilitan y mejoran la estimulación sensorial, cognitiva y motora en relación con las condiciones de alojamiento estándar. El EAM también puede incluir estimulación social alojando un mayor número de animales por jaula para promover la interacción entre ellos.

El EAM consistió en un cubículo de 40 cm de alto, 100 cm de ancho y 80 cm de profundidad. Por dentro se acondicionó con túneles, ruedas de ejercicio voluntario y juguetes de diferente forma, color y textura (Fig 21). Para mantener la novedad, los objetos se cambiaron cada tercer día y fueron lavados con Cloruro de Benzalconio para eliminar los olores. Los animales se alojaron en grupos de 6 a 8 ratas desde el inicio del experimento.



Figura 21. Enriquecimiento ambiental.



Figura 22. Alojamiento estándar.

La figura 23 muestra el diseño experimental que consistió en cuatro grupos experimentales: A) control, animales que estuvieron en condiciones de alojamiento estándar de laboratorio (Fig. 22); B) animales que estuvieron alojados en condiciones de enriquecimiento ambiental antes y durante el protocolo de formación y recuperación de memoria; C) animales que sólo estuvieron alojados en enriquecimiento ambiental durante el periodo de interrupción (después de la prueba de 48 h); y D) grupo al que se le administró 8-OH-DPAT (0.031 mg/kg) y

posteriormente fueron alojados en enriquecimiento ambiental durante el periodo de interrupción.

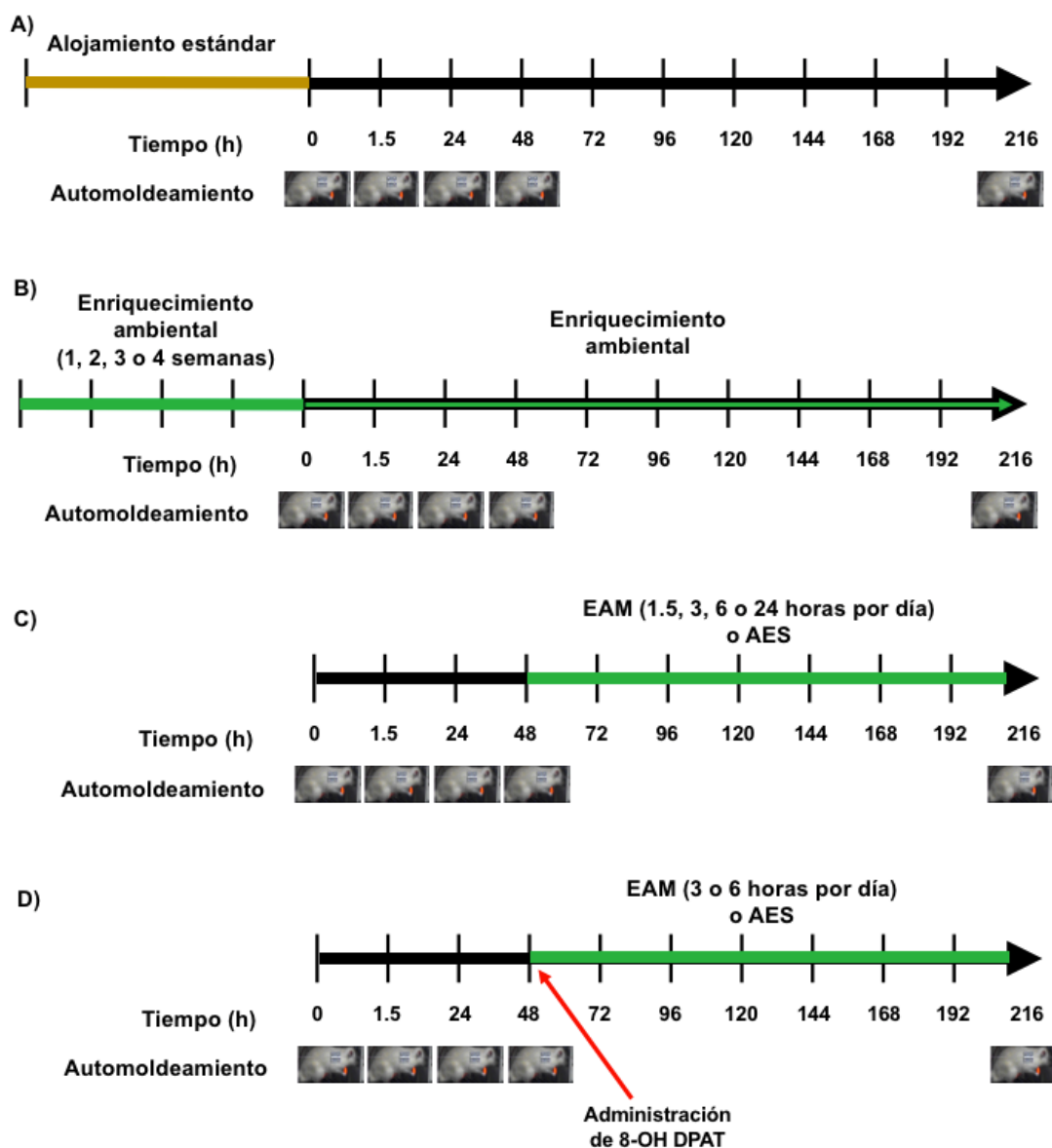


Figura 23. Diseño experimental de enriquecimiento ambiental (EAM). Alojamiento estándar (AES)

5.7 Microarreglos de ADN

Para el análisis de microarreglos, se formaron tres grupos: 1) grupo con máxima retención (a las 48 h), 2) grupo control (animales con memoria extinta), 3) grupo con recuperación de memoria por la administración de WAY 100635 (Fig. 24).

Las etapas de la técnica de microarreglos son:

- a) Extracción de ARN. Aislar ARN de la muestra.
- b) Síntesis y marcado de ADN complementario (ADNc). Para marcar el ARN se utiliza una reacción de síntesis enzimática de ADNc de cadena sencilla.
- c) Hibridación. Las moléculas de ADNc se unen a las sondas de ADN en el portaobjetos.
- d) Lectura y cuantificación. El microarreglo se escanea para medir la expresión de cada gen impreso en la diapositiva. Si la expresión de un gen particular es más alta en la muestra experimental que en la muestra de referencia, entonces el punto correspondiente en la microarreglo aparece rojo. Por el contrario, si la expresión en la muestra experimental es menor que en la muestra de referencia, entonces la mancha aparece verde. Finalmente, si hay una expresión igual en las dos muestras, entonces el punto aparece amarillo.
- e) Análisis. El análisis de los resultados de la hibridación de un microarreglo se puede dividir en dos etapas: (1) análisis estadístico, para identificar los genes expresados diferencialmente en el experimento, y (2) análisis bioinformático, donde los genes identificados se asocian con algún proceso biológico.

Los datos obtenidos a través de microarreglos se pueden utilizar para crear perfiles de expresión génica, que muestran cambios simultáneos en la expresión de muchos genes en respuesta a una condición o tratamiento particular (Ramirez et al., 2014)

Para la extracción de ARN los animales se sacrificaron por decapitación, se extrajo el cerebro y se disectó el hipocampo. El hipocampo se almacenó en refrigeración a -70 °C. La purificación de ARN se realizó con la técnica de purificación con Trizol (Fig. 25). Una vez que se obtuvieron las muestras de ARN (Fig. 27), se enviaron a La Unidad de Microarreglos de ADN del Instituto de

Fisiología Celular de la UNAM para su procesamiento. La presencia de las subunidades ribosomales 28 s (banda superior) y 18 s (banda inferior) indican que el ARN fue extraído exitosamente (Fig. 26).

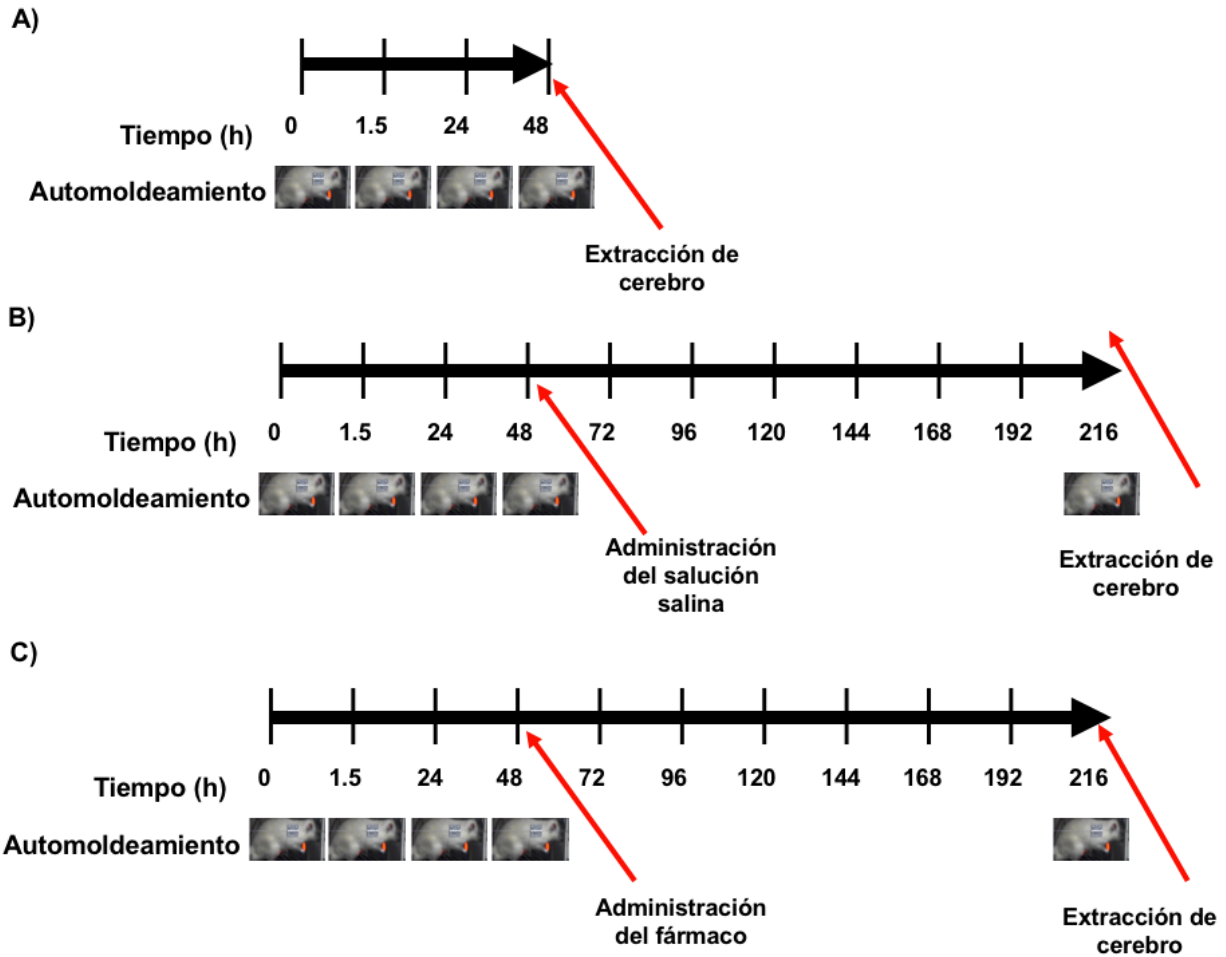


Figura 24. Protocolo experimental para el análisis de microarreglos.

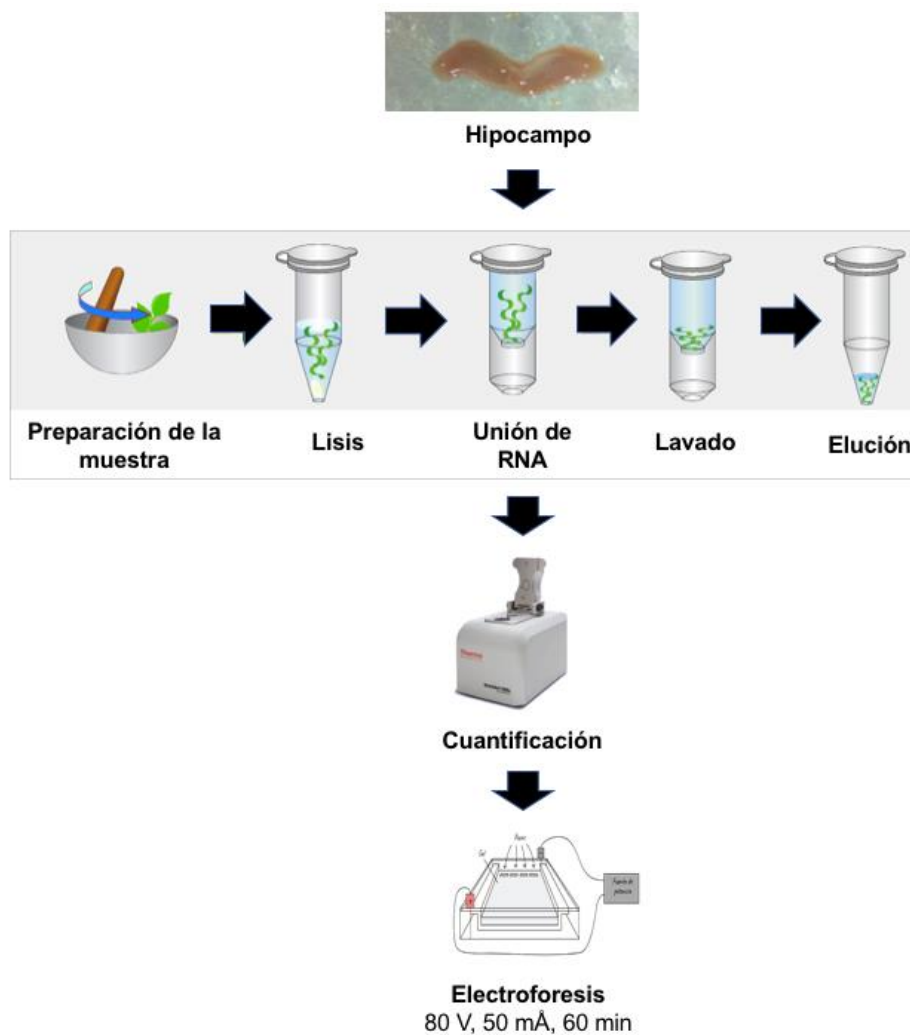


Figura 25. Purificación del ARN.

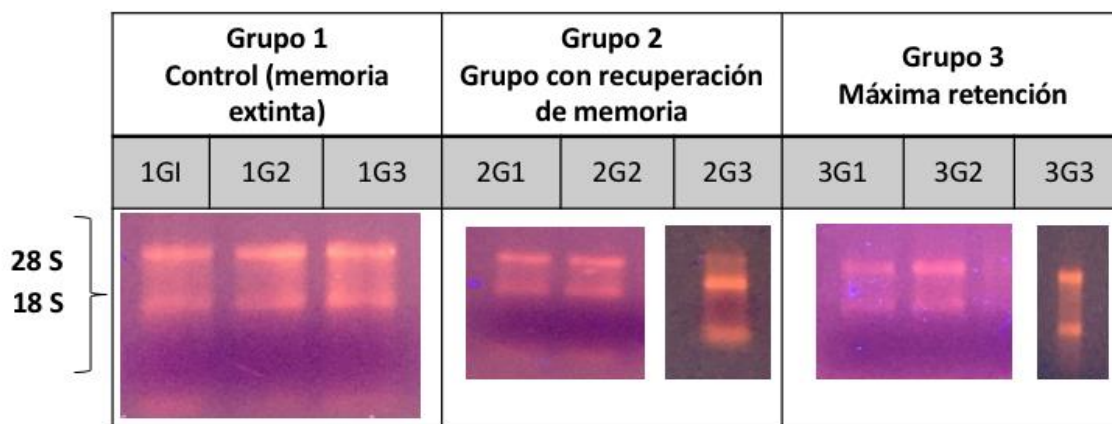


Figura 26. Geles de electroforesis.

5.8 Análisis estadístico

Las comparaciones entre los grupos de formación y recuperación de memoria (control), se hicieron mediante un ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey. La prueba t de Student se aplicó cuando los datos de control se normalizaron como porcentaje de las RC, comparando las RC en la máxima retención con las RC de la prueba de recuperación de memoria. En los grupos que recibieron tratamiento farmacológico se empleó un ANOVA de dos vías seguida de la prueba Tukey o Dunnet para las siguientes comparaciones: 1) cada grupo se comparó a las 48 vs 216 h; y 2) cada grupo administrado con el fármaco se comparó con el grupo control (a 216 h). Los resultados fueron calculados por SigmaPlot v12.0 (Systat Software, San José, CA, EE. UU.). Como criterios de significancia se usó una $p < 0.05$ (Fig. 27).

5.9. Diseño experimental.

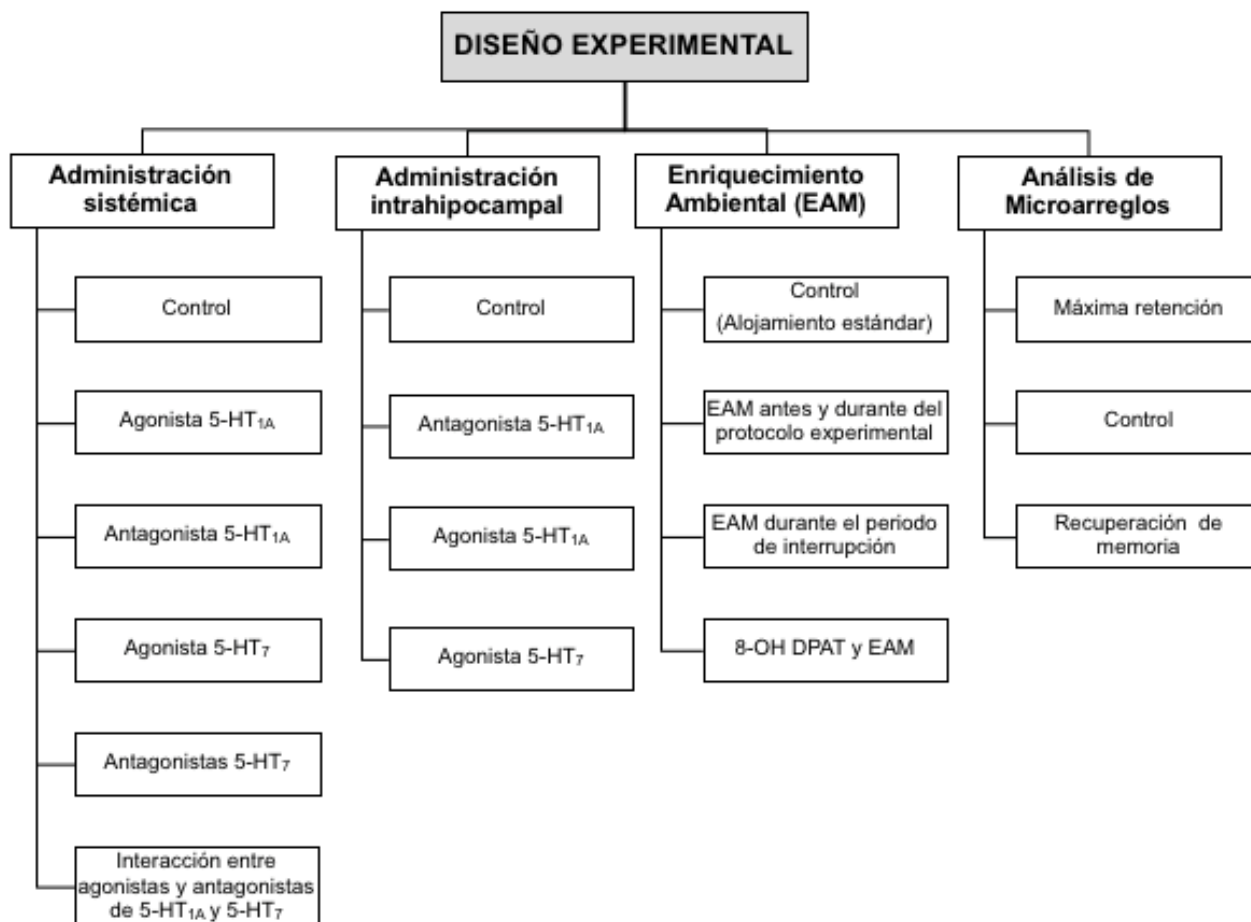


Figura 27. Diseño experimental.

6. Resultados

6.1 Formación y recuperación de memoria

La figura 28 muestra el curso de formación de memoria desde las 0 hasta las 48 h (máxima retención). La media \pm e.e. a las 0, 1.5, 24 y 48 h fueron $9 \pm 5\%$, $15 \pm 3\%$, $23 \pm 3\%$, y $39 \pm 5\%$, respectivamente. De manera interesante, se observó una disminución en el %RC a las 216 h ($16 \pm 4\%$), cuando se comparó con el %RC de máxima retención (ANOVA de una vía) [$F_{(4,60)} = 6.82$; $p < 0.001$]. El análisis post-hoc (Tukey) reportó un aumento significativo ($p < 0.05$) en el %RC entre los tiempos 1.5 h y 48 h. Los datos crudos del curso temporal de las respuestas condicionadas (%RC) durante la formación de memoria y la recuperación de la memoria se muestran en la figura 28A, mientras que los datos normalizados se muestran en la figura 28B. Dado que los niveles de máxima retención varían en cada animal, se consideró la máxima retención como el 100% de la memoria adquirida, a partir de los cuales se calculó (la proporción en porcentaje) el %RC a las 216 h, como previamente se reportó (Tellez et al., 2012). Esta normalización de datos se observa en la figura 28B, donde hay disminución significativa (prueba de t pareada; $p < 0.05$) de 39.8 ± 8.1 desde la máxima retención (100 %).

6.2 Efecto del L-triptófano en la recuperación de la memoria

La figura 29 muestra el efecto del L-triptófano (50 y 100 mg/kg) sobre la recuperación de la memoria. De manera interesante, la dosis de 100 mg/kg de L-triptófano mostró un aumento significativo ($103 \pm 29\%$ RC) (Método de Dunnett, $p < 0.05$) cuando fue comparado con el grupo de control de solución salina ($40 \pm 12\%$ RC) después del período de interrupción. La dosis de 50 mg/kg mostró un incremento (no significativo), en la recuperación de la memoria ($78 \pm 23\%$ RC). El ANOVA de dos vías reveló diferencias significativas sólo entre tiempos [$F_{(1,38)} = 4.27$, $p = 0.046$].

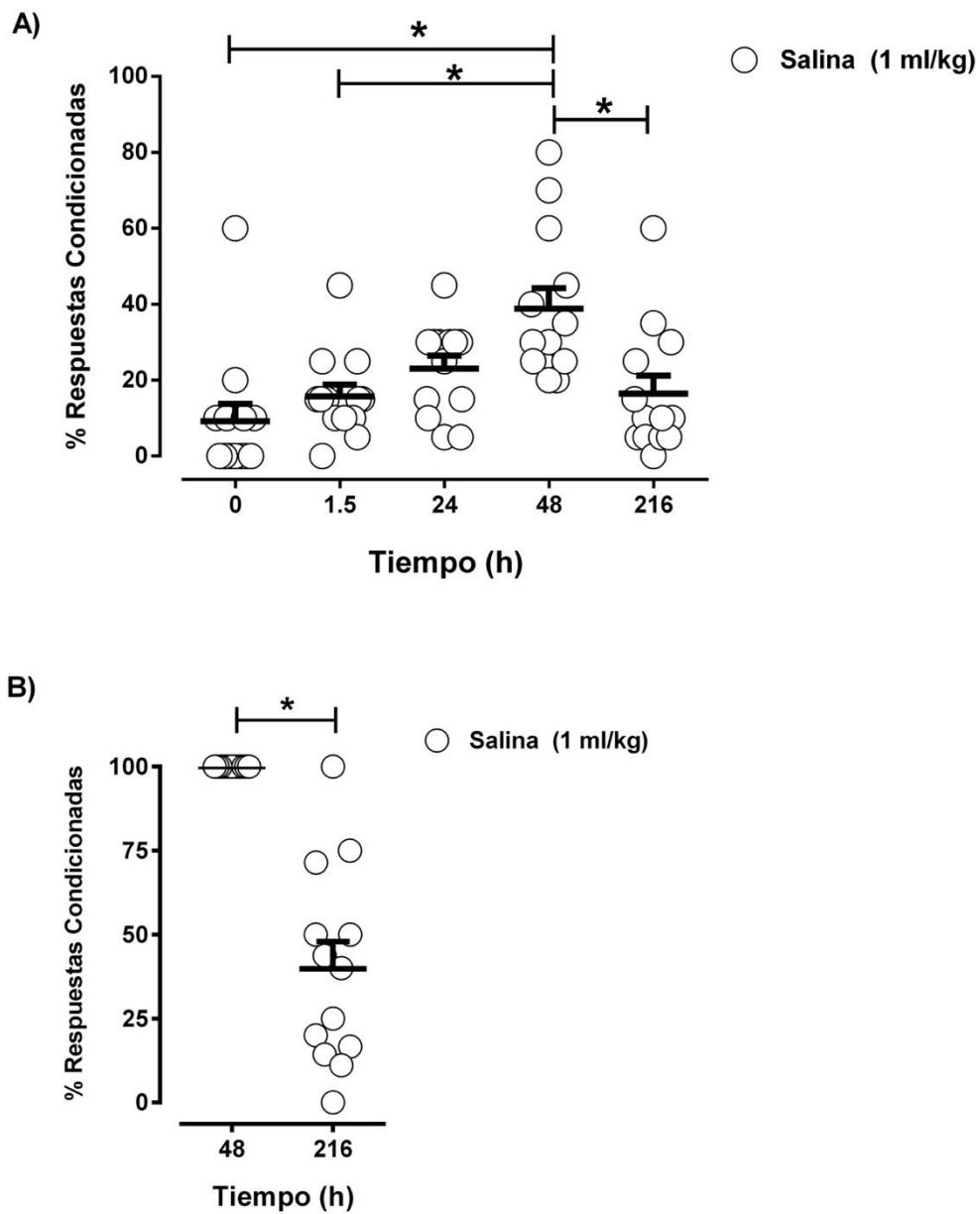


Figura 28. Formación y recuperación de memoria.

A) Datos crudos del curso temporal de formación de memoria hasta las 48 h (máxima retención) y la disminución de la retención de la memoria a las 216 h. B) Datos normalizados como un porcentaje de retención máxima y porcentaje de recuperación de memoria después de siete días sin sesiones de automoldeamiento. Cada barra representa la media \pm S.E.M. de 13 animales. Los datos se analizaron mediante la prueba de t pareada. * $p < 0.05$.

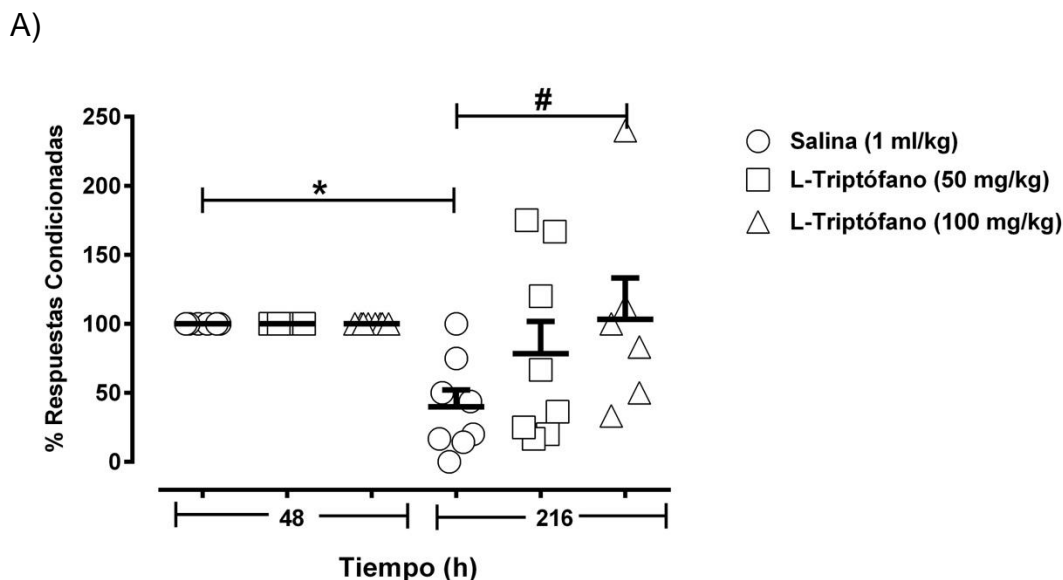


Figura 29. Efecto del L-triptófano en la recuperación de la memoria.

Cada barra representa la media \pm S.E.M. de 6-8 animales. Los datos se analizaron con un ANOVA de dos vías y la prueba de Dunnett. * $p < 0.05$ cuando se compara el grupo salina a las 48 y 216 h. # $p < 0.05$ en la comparación del grupo salina vs L-triptófano a las 216 h.

En este punto, es conveniente enfatizar que en la figura 30 todas las barras de la izquierda representan una retención máxima de cada grupo evaluado (datos normalizados). Por lo que, para una mejor visualización, las figuras posteriores mantendrán una única barra para indicar la retención máxima a las 48 h de todos los grupos.

6.3 Efecto de un agonista (8-OH-DPAT) y un antagonista (WAY 100635) de los receptores 5-HT_{1A} en la recuperación de la memoria.

La Figura 30 muestra el efecto de 8-OH-DPAT (0.031 o 0.062 mg/kg), un agonista del receptor 5-HT_{1A}, a las 216 h sobre la recuperación de la memoria. Notablemente, el 8-OH-DPAT aumentó significativamente, de manera dependiente de la dosis, el %RC cuando se comparó con el grupo control de salina. El ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas respecto a los tratamientos [$F_{(2,42)}=4.0$, $p = 0.028$], tiempos [$F_{(1,42)}=8.2$, $p < 0.006$] y la interacción de estas variables

[$F_{(2,42)}=4$, $p = 0,028$]. La prueba post-hoc de Dunnett mostró que el %RC de 8-OH-DPAT (0.031 mg/kg) aumentó y fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$) vs control, mientras que la dosis del grupo de 0.062 mg/kg tuvo un efecto mayor ($p < 0.05$) en comparación con el grupo de control (Fig. 30).

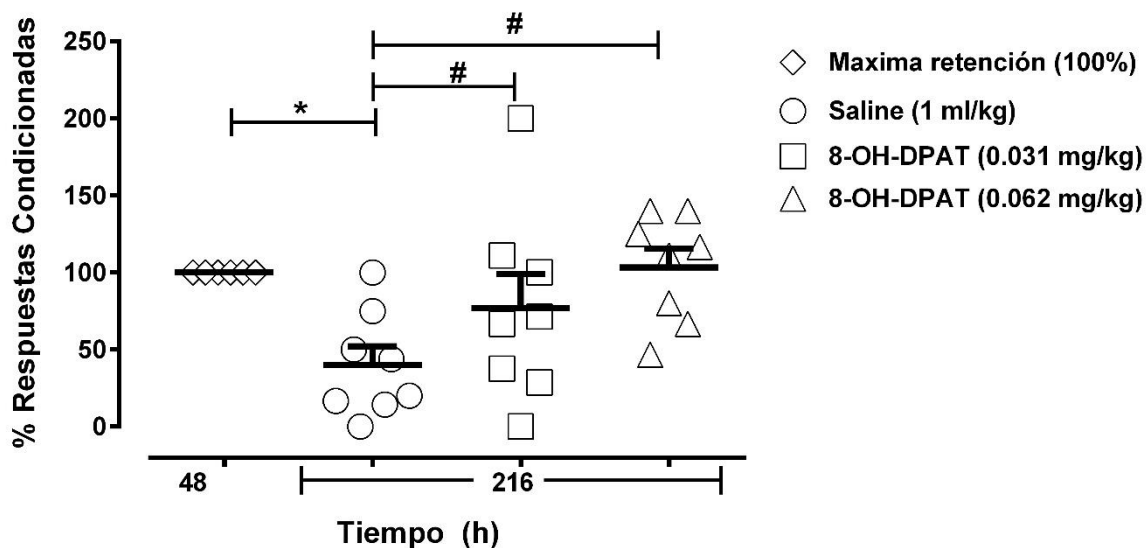


Figura 30. Efecto del 8-OH-DPAT en la recuperación de la memoria.

Cada barra representa la media \pm S.E.M. de 7-8 animales. Los datos se analizaron con un ANOVA de dos vías y Dunnett. * $p < 0.05$, en comparación con la máxima retención (48 h). # $p < 0.05$, 8-OH-DPAT vs solución salina a las 216 h.

La figura 31 muestra el efecto del antagonista selectivo del receptor 5-HT_{1A}, WAY 100635 (0.3 o 0.6 mg/kg) en la recuperación de la memoria. De manera interesante, WAY 100635 aumentó de manera dependiente de la dosis el %RC cuando se comparó con el grupo control de solución salina. El ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas respecto a los tratamientos [$F_{(2,40)}=12.5$, $p < 0.001$], tiempos [$F_{(1,40)}= 0.00000485$, $p < 0.001$] y la interacción de estas variables [$F_{(2,40)}= 2,5$, $p < 0.001$]. Cabe destacar que la dosis de 0.6 mg/kg de WAY 100635 aumentó significativamente el porcentaje de %RC hasta el 180%.

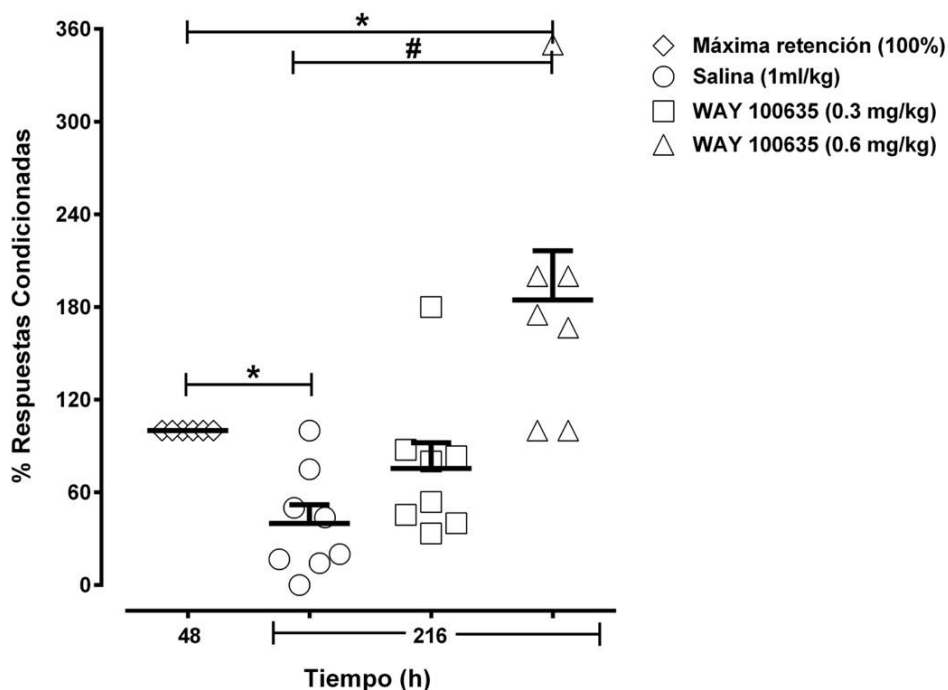


Figura 31. Efecto de WAY 100635 en la recuperación de la memoria.

Cada barra representa la media \pm S.E.M. de 7-8 animales. Los datos se analizaron con un ANOVA de dos vías y Dunnett. * $p < 0.05$, en comparación con la máxima retención (48 h). # $p < 0.05$, WAY 100635 vs solución salina a las 216 h.

Con el objetivo de determinar una posible interacción farmacológica entre ambos fármacos que actúan en el receptor 5-HT_{1A}, combinamos la dosis menor y mayor de cada uno de ellos. Así, la figura 32 muestra el efecto de la coadministración de 8-OH-DPAT (0.031 mg/kg) + WAY 100635 (0.3 mg/kg) o la coadministración 8-OH-DPAT (0.062 mg/kg) + WAY 100635 (0.6 mg/kg). De manera inesperada, ambas coadministraciones no lograron aumentar significativamente el %RC cuando se comparó con el grupo control de solución salina a las 216 h (Fig. 32). El ANOVA de dos vías no mostró diferencias significativas respecto a los tratamientos [$F_{(2,40)}=0.52$, $p = 0.599$], aunque sí reportó diferencias significativas respecto al tiempo [$F_{(1,40)}= 81.395$, $p < 0.001$]; por último, la interacción de las variables tampoco mostró diferencias [$F_{(2,40)}= 0.52$, $p = 0.599$].

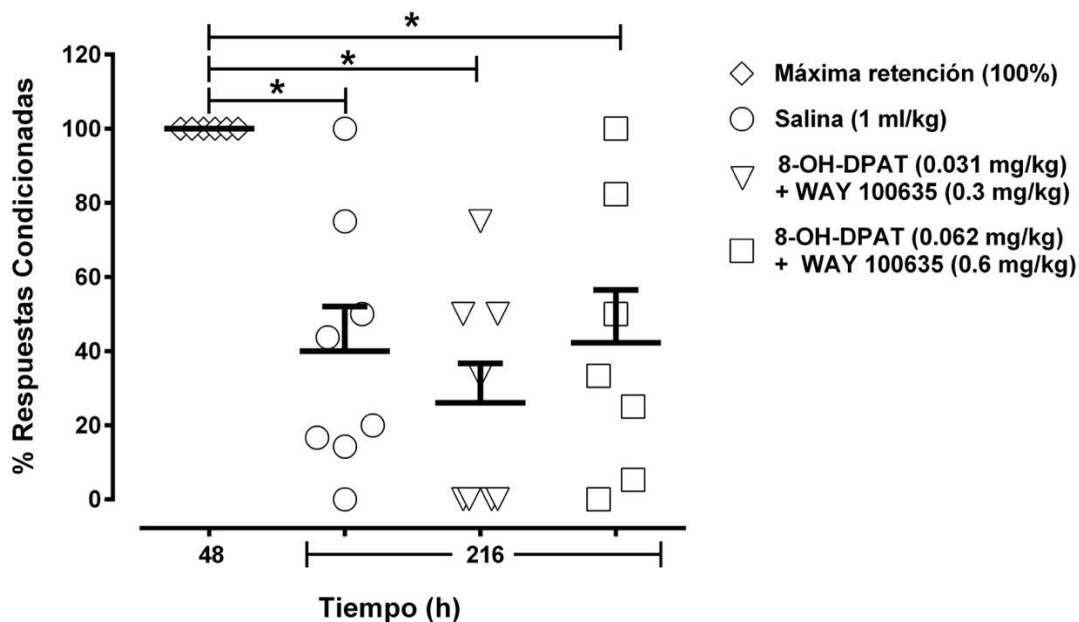


Figura 32. Efecto de la co-administración de 8-OH-DPAT + WAY 100635 en la recuperación de la memoria.

Cada barra representa la media \pm S.E.M. de 7-8 animales. Los datos se analizaron con un ANOVA de dos vías y Dunnett. * $p < 0.05$, en comparación con la máxima retención (48 h). # $p < 0.05$, 8-OH-DPAT + WAY 100635 vs solución salina a las 216 h.

6.4 Efecto de un agonista (LP 211) y dos antagonistas (SB 269970 – LY 215840) de los receptores 5-HT₇ en la recuperación de la memoria.

La figura 33 muestra el efecto de LP 211, un agonista de los receptores 5-HT₇, sobre la recuperación de la memoria. Los resultados revelaron que el LP 211: (1) no modificó significativamente la recuperación de la memoria, a la dosis de 0.5 mg/kg en comparación con su vehículo (etanol al 10%); y (2) la recuperación de memoria fue dependiente de la dosis (1.0, 2.5, 5.0 o 10.0 mg/kg). El ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas respecto a los tratamientos [$F_{(5,60)}=2.8$, $p < 0.022$], el tiempo [$F_{(1,60)}= 16.7$, $p < 0.001$] y la interacción entre ambas variables [$F_{(5,60)}= 2.8$, $p < 0.022$]. La dosis de 0.5 mg/kg de LP 211 disminuyó significativamente el %RC (Método de Dunnett, $p < 0.05$) al compararlo con la máxima retención a las 48 h, aunque no fue significativamente diferente al grupo de control de etanol al 10%

a las 216 h. Además, el LP 211, a las dosis de 5.0 y 10.0 mg/kg, mejoró la recuperación de la memoria [Método de Dunnett, $p < 0.05$]

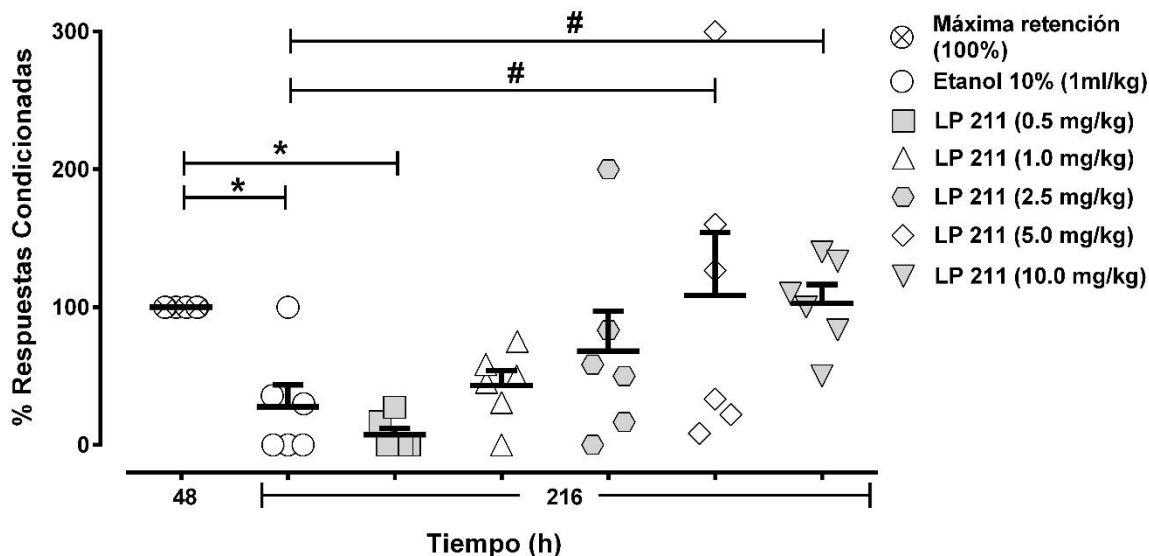


Figura 33. Efecto del LP 211 en la recuperación de la memoria.

Cada barra representa la media \pm S.E.M de 6-10 animales. Los datos se analizaron con un ANOVA de dos vías y Dunnett. * $p < 0.05$, en comparación con la máxima retención. # $p < 0.05$ vs vehículo (etanol al 10%) a las 216 h.

En contraste, la figura 34 muestra que los antagonistas SB 269970 (1.0 y 10.0 mg/kg; 5-HT₇) y LY 215840 (1.0 y 20 mg/kg; 5-HT₂₇), administrados solos, no afectaron la recuperación de la memoria en comparación con su vehículo (solución salina). El ANOVA de dos vías sólo mostró diferencias significativas [$F_{(1,74)}=53.79$, $P < 0.001$] respecto al tiempo (48 vs 216 h). Finalmente, la figura 35 muestra que la coadministración de SB 269970 (10.0 mg/kg) + LP 211 (2.5 mg/kg) mejoró la recuperación de la memoria ya que produjo un aumento de %RC ($134 \pm 37\%$) a las 216 h.

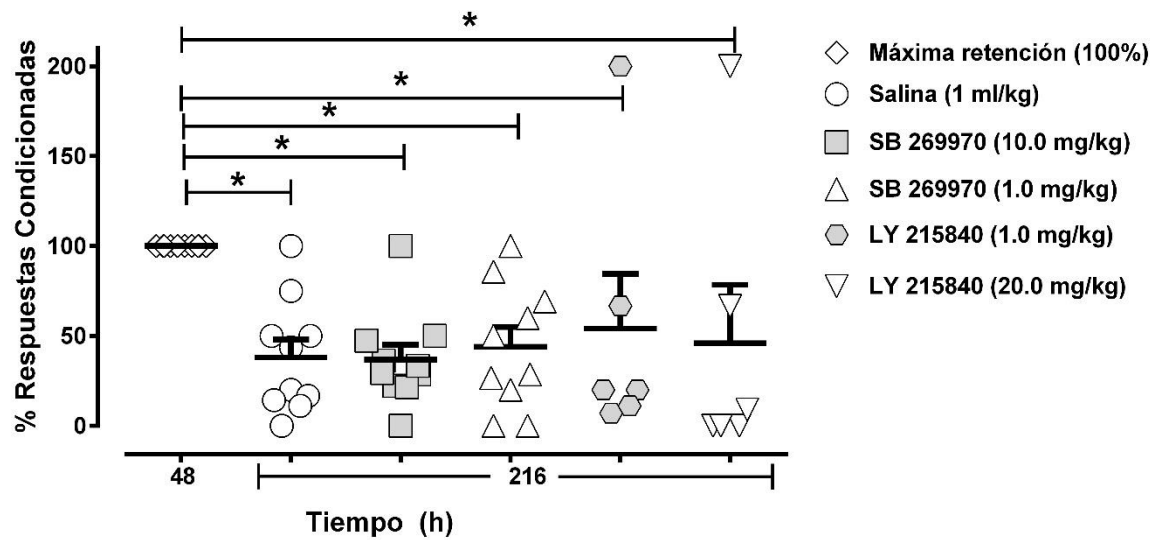


Figura 34. Efecto del SB 269970 y LY 215840 en la recuperación de la memoria. Cada barra representa la media \pm S.E.M de 6-10 animales. Los datos se analizaron con un ANOVA de dos vías y Dunnett. * $p < 0.05$, en comparación con la máxima retención. # $p < 0.05$ vs vehículo (salina) a las 216 h.

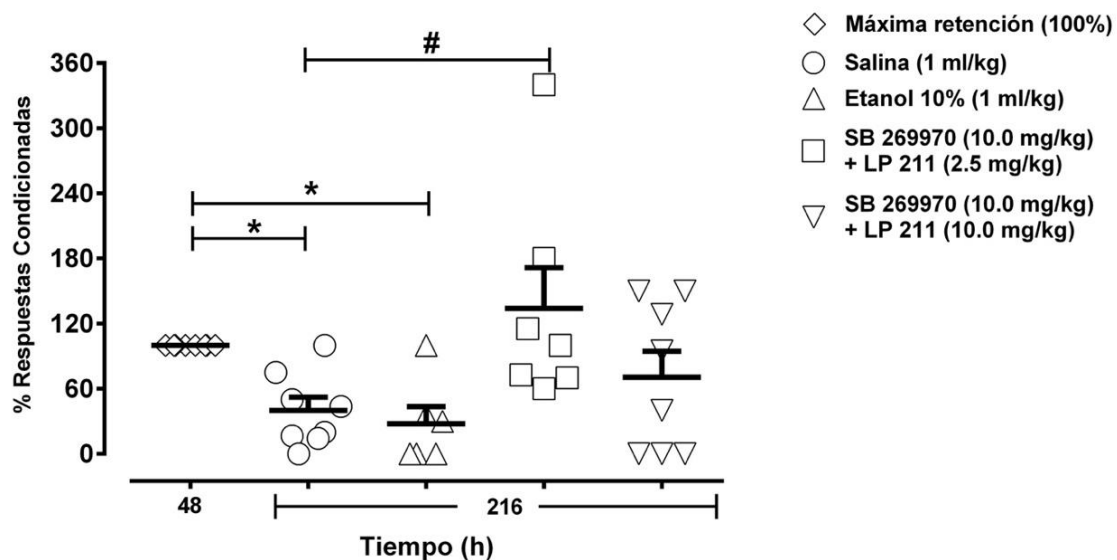


Figura 35. Efecto de la coadministración de SB 269970 + LP 211 en la recuperación de la memoria. Cada barra representa la media \pm S.E.M de 6-10 animales. Los datos se analizaron con un ANOVA de dos vías y Tukey. * $p < 0.05$, en comparación con la máxima retención. # $p < 0.05$ vs vehículo (salina y etanol al 10%) a las 216 h.

Este grupo mostró incrementos significativos de %RC (prueba de Tukey, $p < 0.05$) cuando fue comparado con grupo control de solución salina. El ANOVA de dos vías de la coadministración de antagonistas y agonistas del receptor 5-HT₇ mostró diferencias significativas con respecto a los tratamientos [$F_{(5,50)} = 3.6$, $p < 0.019$], tiempos [$F_{(1,50)}=6.8$, $p = 0.012$] y sus interacciones [$F_{(3,50)}=3.6$, $p < 0.019$]. Es importante destacar que la dosis de 10 mg/kg de SB 269970 bloqueó el efecto en la recuperación de la memoria de LP 211 (10 mg/kg), cuando ambos fármacos se administraron conjuntamente.

Este primer bloque de resultados sugiere la participación de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇ en la recuperación de la memoria. Para seguir explorando la importancia de ambos receptores en este proceso, se procedió a realizar administraciones “cruzadas”, esto es, co-administraciones de fármacos agonistas y antagonistas de uno u otro receptor.

6.5 Efecto de las interacciones entre agonistas y antagonistas de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇ en la recuperación de la memoria.

La figura 36 muestran los resultados de las siguientes coadministraciones: **(1)** 8-OH-DPAT (0.031 mg/kg) + LP 211 (10.0 mg/kg); **(2)** 8-OH-DPAT (0.031 mg/kg) + SB 269970 (1.0 mg/kg) y **(3)** WAY 100635 (0.6 mg/kg) + LP 211 (10.0 mg/kg). Dichos tratamientos no cambiaron el %RC comparado con el grupo control-salina. De manera interesante la coadministración de WAY 100635 0.6 mg/kg + SB 269970 10.0 mg/kg incrementó el %RC mejorando la recuperación de la memoria. El ANOVA de dos vías arrojó diferencias significativas respecto al tiempo [$F_{(1,66)}=10.572$, $p=0.002$] (Fig. 36) y la prueba post-hoc indicó que la coadministración de WAY 100635 0.6 mg/kg + SB 269970 10.0 mg/kg tuvo diferencias significativas comparado con el grupo control-salina (Dunnett, $p < 0.05$).

Para seguir dilucidando la participación de uno y otro receptor se realizó una triple administración que consintió en bloquear ambos receptores (con antagonistas) y administrar un agonista para 5-HT_{1A} o 5-HT₇.

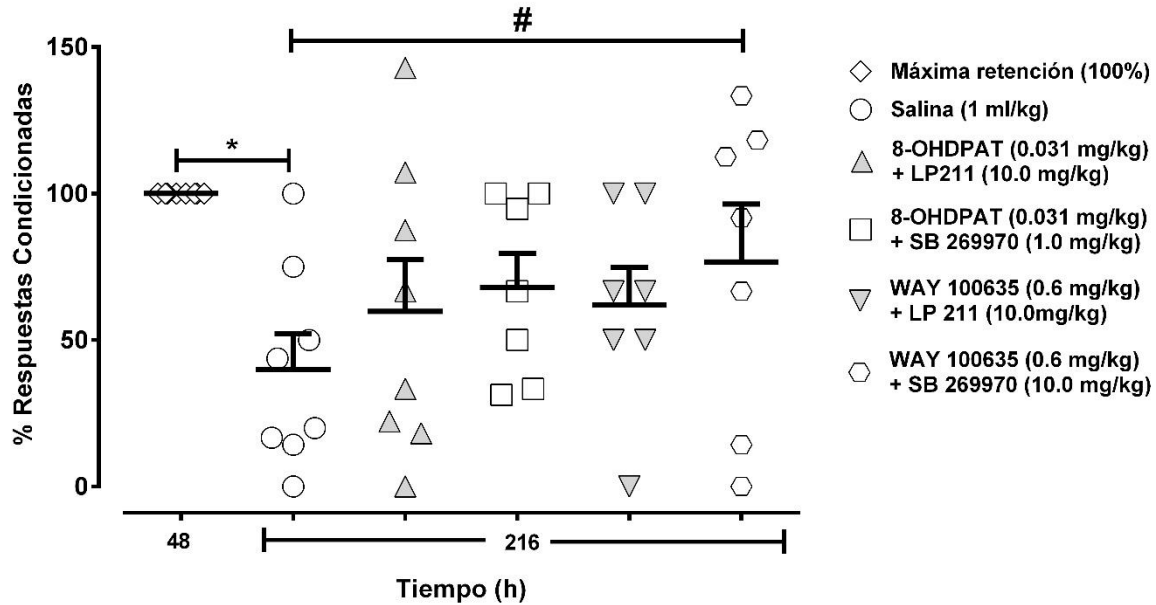


Figura 36. Efecto de la interacción entre agonistas y antagonistas de 5-HT_{1A} y 5-HT₇.

Cada barra representa la media \pm S.E.M de 7-8 animales. Los datos se analizaron con un ANOVA de dos vías y Dunnett. * $p < 0.05$, en comparación con la máxima retención. # $p < 0.05$ grupos tratados vs vehículo (salina) a las 216 h.

6.6 Efecto de las triples administraciones

La figura 37 muestra el efecto de la triple administración de: (1) SB 269970 (1.0 mg/kg) + WAY 100635 (0.3 mg/kg) + 8-OH-DPAT (0.031 mg/kg) y (2) SB 269970 (1.0 mg/kg) + WAY 100635 (0.3 mg/kg) + LP 211 (5.0 mg/kg). Así, la coadministración de SB 269970 (1.0 mg/kg) + WAY 100635 (0.3 mg/kg) + 8-OH-DPAT (0.031 mg/kg) mejoró la recuperación de memoria cuando fue comparado con grupo control de solución salina (Dunnett, $p < 0.05$). El ANOVA de dos vías indicó diferencias significativas respecto al tiempo [$F_{(1,46)}=9.63$, $p = 0.003$].

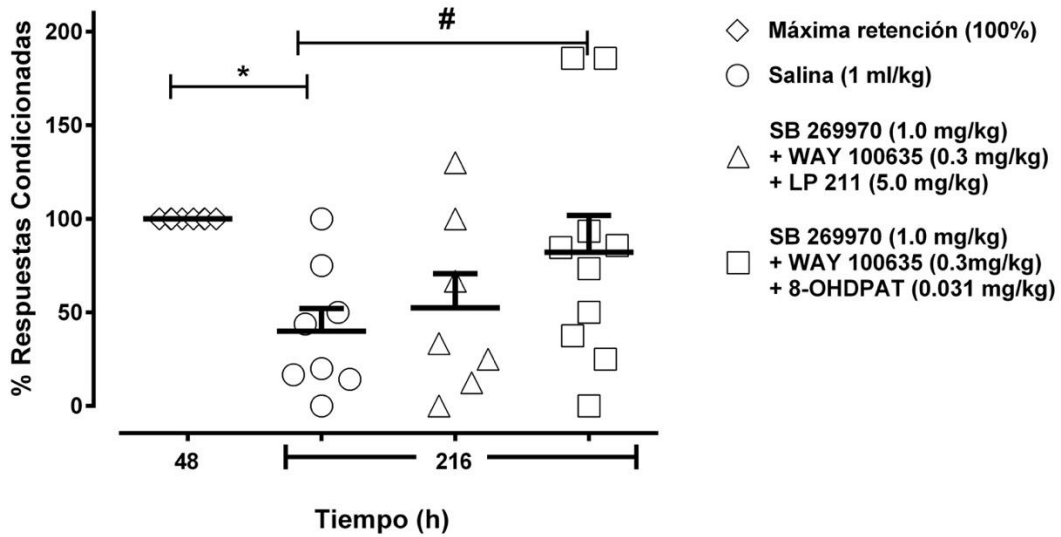


Figura 37. Efecto de la triple administración en la recuperación de la memoria. Cada barra representa la media \pm S.E.M de 6-10 animales. Los datos se analizaron con un ANOVA de dos vías y Dunnet * $p < 0.05$, en comparación con la máxima retención. # $p < 0.05$ grupos con tratamiento vs salina a las 216 h

Con la finalidad de identificar el lugar en el cuál se están llevando a cabo los efectos previamente reportados, se propuso estudiar la región CA1 del hipocampo.

6.7 Efecto de la administración de algunos fármacos en la región CA1 del hipocampo en la recuperación de la memoria

La figura 38 es una fotografía que muestra la región CA1 del hipocampo, lugar donde los fármacos fueron administrados.

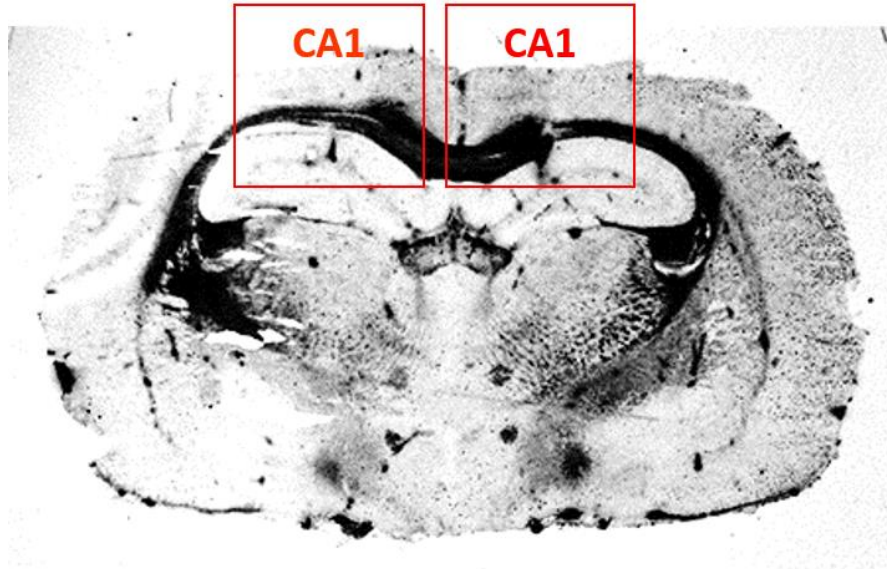


Figura 38. Región CA1 del hipocampo (corte coronal).

La figura 39 comparó el curso de formación y recuperación de la memoria en animales sin cirugía (control salina sistémico) y animales con cirugía estereotáxica (control salina en CA1). El ANOVA de dos vías no mostró diferencias significativas asociadas a la vía de administración de la solución salina [$F_{(1,110)}=0.17$, $P=0.679$]; sí para el tiempo [$F_{(4,110)}= 12.77$, $p < 0.001$] y tampoco hubo diferencias para la interacción [$F_{(1,110)}=0.13$, $P=0.972$].

De manera notable, la prueba post-hoc (Tukey; $p < 0.05$) mostró una diferencia significativa entre los tiempos 48 y 216 h. La tabla 4 muestra los valores de la media \pm e.e.m. en cada tiempo evaluado

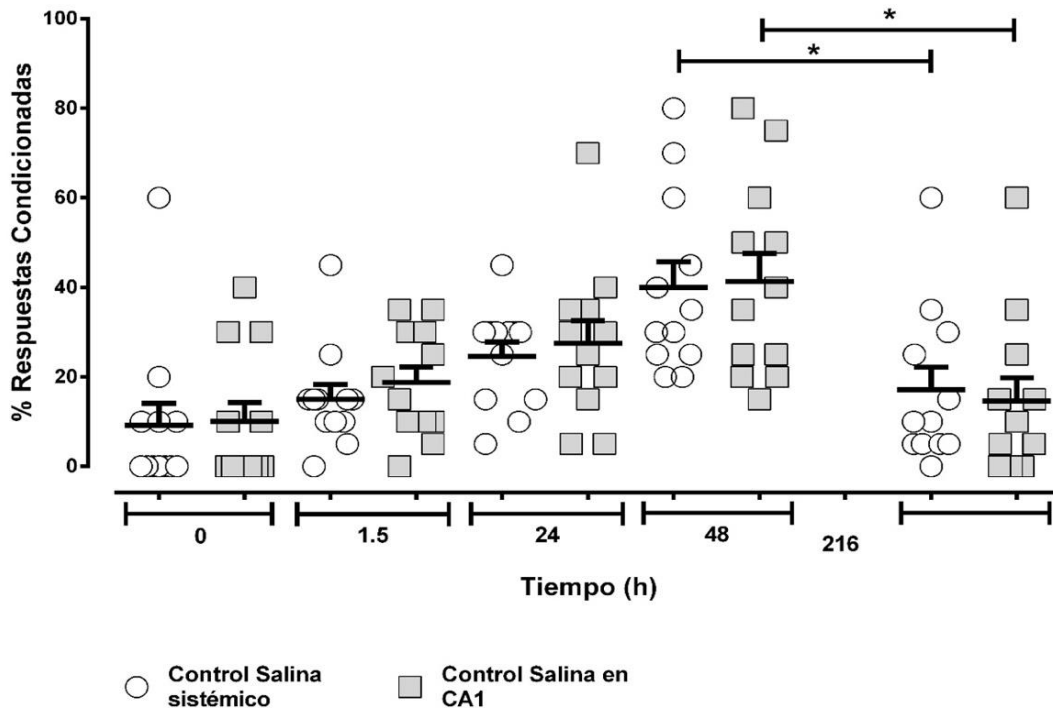


Figura 39. Curva de formación y recuperación de la memoria en dos vías de administración.

Cada barra representa la media \pm S.E.M de 12 animales. Los datos se analizaron con un ANOVA de dos vías y Tukey. * $p < 0.05$, en comparación con la máxima retención (48 h)

Tabla 4. Curso temporal de la formación de memoria (%RC)			
Tiempo	Animales	n	Media \pm EEM (%RC)
0	Sin cirugía	12	9.2 \pm 5
	Con cirugía	12	10 \pm 4.3
1.5	Sin cirugía	12	15 \pm 3.3
	Con cirugía	12	18.75 \pm 3.5
24	Sin cirugía	12	24.6 \pm 3.2
	Con cirugía	12	27.5 \pm 5
48	Sin cirugía	12	40 \pm 5.8
	Con cirugía	12	41.25 \pm 6.3
216	Sin cirugía	12	17.08 \pm 5
	Con cirugía	12	14.58 \pm 5.2

6.7.1 Efecto en la recuperación de la memoria de la administración de 8-OH-DPAT, WAY 100635, o LP 211 en la región CA1 del hipocampo.

La figura 40 muestra que la administración de 8-OH-DPAT (0.5 y 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) o de WAY 100635 (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) en la región CA1 del hipocampo no afectó la recuperación de la memoria cuando se compararon con el grupo control de solución salina. El ANOVA de dos vías arrojó los siguientes resultados: para el tratamiento [$F_{(3,54)}=0.273$, $p=0.844$]; el tiempo [$F_{(1,54)}= 57.19$, $p < 0.001$] y para la interacción [$F_{(3,54)}=0.273$, $p=0.844$]. La figura 41 se observa que la administración de LP 211 (0.925, 3.7 y 7.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) en la región CA1 del hipocampo no modificó la recuperación de la memoria. El ANOVA de dos vías indicó: para el tratamiento [$F_{(3,48)}=0.44$, $p=0.727$]; para el tiempo [$F_{(1,40)}= 57.357$, $p < 0.001$] y para la interacción [$F_{(1,48)}=0.437$ $p=0.727$].

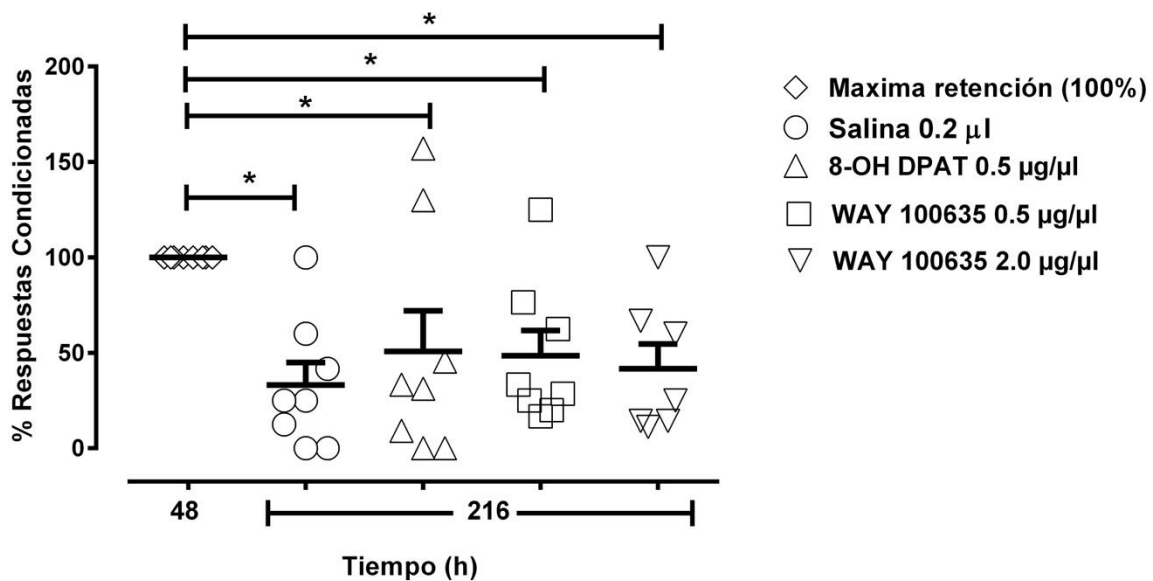


Figura 40. Efecto en la recuperación de la memoria de la administración de 8-OH-DPAT y WAY 100635 en la región CA1 del hipocampo.

Cada barra representa la media \pm S.E.M de 7-8 animales. Los datos se analizaron con un ANOVA de dos vías. * $p < 0.05$, en comparación con la máxima retención (48 h)

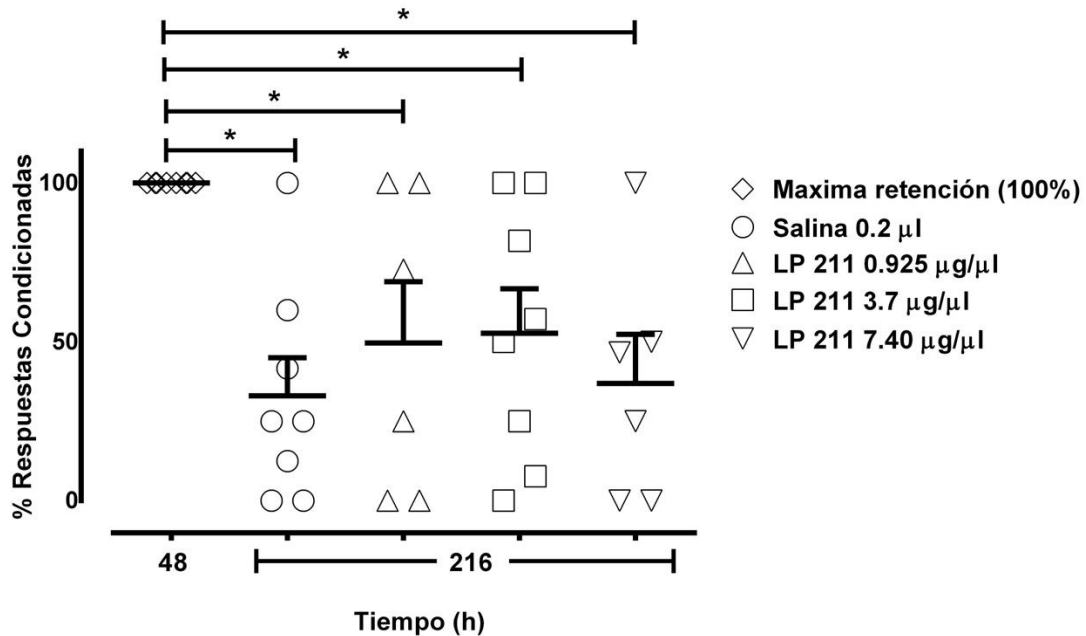


Figura 41. Efecto en la recuperación de la memoria de la administración de LP 211 en la región CA1 del hipocampo.

Cada barra representa la media \pm S.E.M de 6-8 animales. Los datos se analizaron con un ANOVA de dos vías. * $p < 0.05$, en comparación con la máxima retención (48 h)

6.8 Efecto del enriquecimiento ambiental (EAM) en la recuperación de la memoria

6.8.1 Efecto del EAM antes y durante el protocolo experimental

La figura 42 muestra el efecto de implementar el EAM antes y durante el protocolo de experimentación. Los diferentes grupos (1, 2, 3 o 4 semanas en EAM) no mostraron diferencias durante la formación ni recuperación de memoria cuando se compararon con el grupo que estuvo en condiciones de alojamiento estándar. El ANOVA de dos vías indicó lo siguiente: para el tratamiento [$F_{(1,36)}=1.77$, $p=0.192$]; para el tiempo [$F_{(1,36)}= 24.5$, $p < 0.001$] y para la interacción [$F_{(1,36)}=1.77$, $p=0.192$].

La figura 43 muestra el efecto de 3 horas de EAM por día durante 7 días del EAM previo al protocolo de experimentación. El análisis estadístico de ANOVA de dos vías indicó lo siguiente: para el tratamiento [$F_{1,20}=0.23$, $p=6.34$]; para el tiempo [$F_{1,20}= 28.34$, $p < 0.001$] y para la interacción [$F_{1,20}=0.23$, $p=6.34$]. Estos resultados

sugieren que bajo estas condiciones experimentales, el EAM previo no mejoró la recuperación de la memoria.

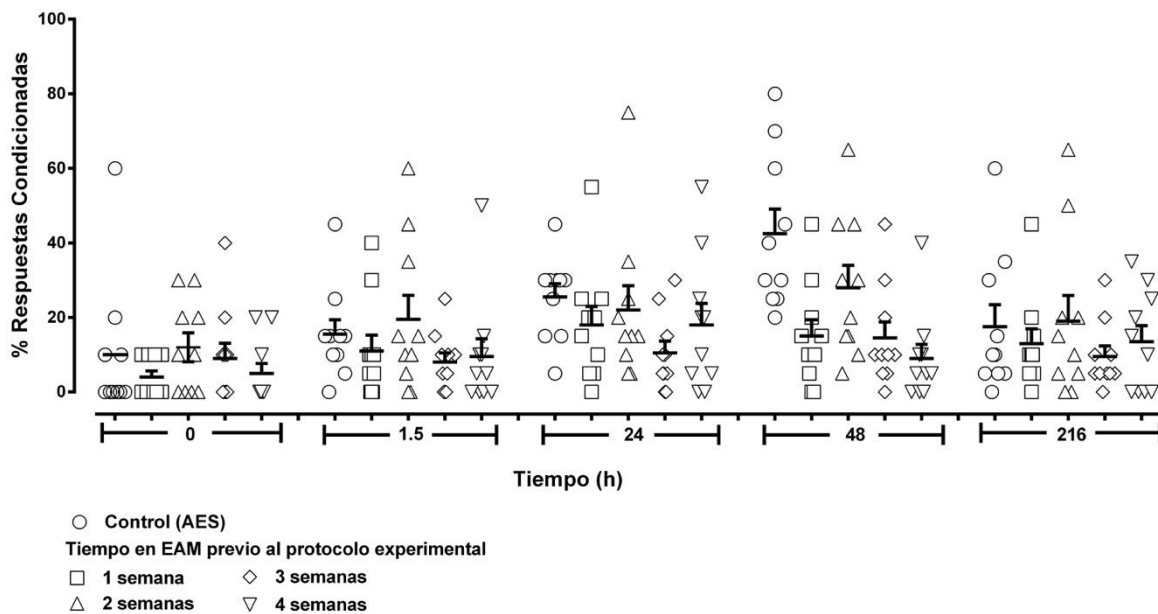


Figura 42. Efecto del EAM antes y durante el protocolo experimental.

Cada barra representa la media \pm S.E.M de 10 animales. Los datos se analizaron con un ANOVA de dos vías.

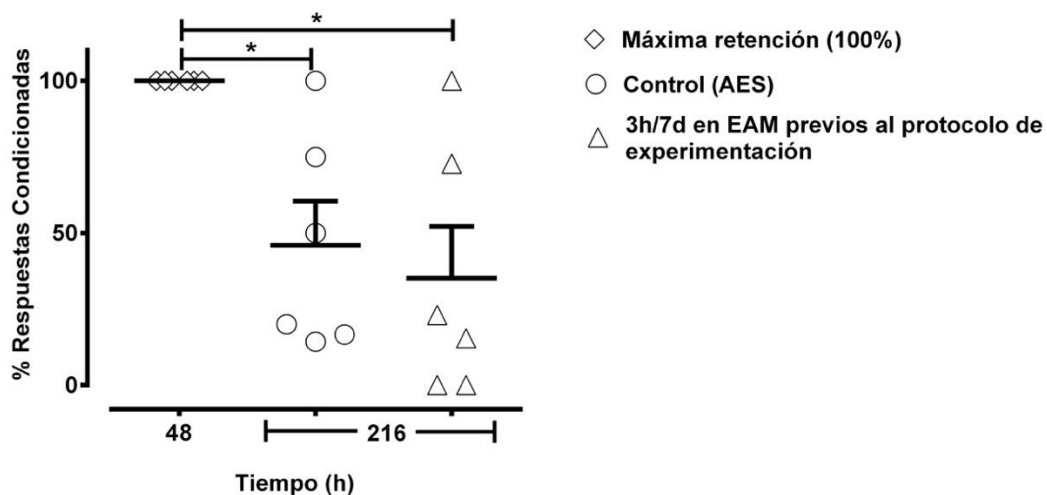


Figura 43. Efecto del enriquecimiento ambiental previo al protocolo de experimentación.

Cada barra representa la media \pm S.E.M de 6 animales. Los datos se analizaron con un ANOVA de dos vías. * $p < 0.05$, en comparación con la máxima retención (48 h).

6.8.2 Efecto del EAM durante el periodo de interrupción

La figura 44 corresponde al efecto del EAM durante el periodo de interrupción. Los diferentes grupos se alojaron en estas condiciones una vez que llegaron a la máxima retención (48 h). Los grupos que estuvieron 3 o 6 h en EAM mostraron diferencias significativas en la recuperación de la memoria respecto al grupo que estuvo en AES (Dunnett, $p < 0.05$). El ANOVA de dos vías indicó para el tratamiento [$F_{(4,74)}=3.6$, $p=0.01$]; para el tiempo [$F_{(1,74)}= 1.3$, $p=0.261$] y para la interacción [$F_{(4,74)}=3.6$, $p=0.01$].

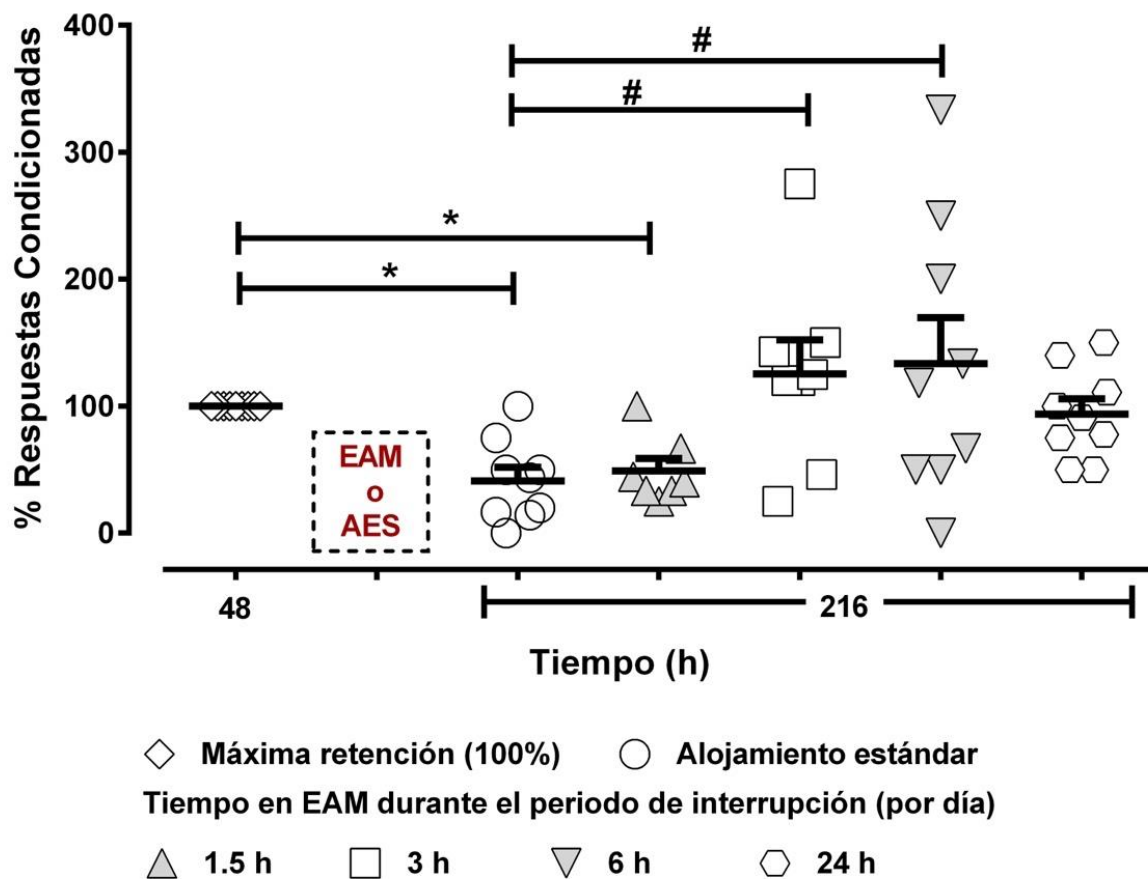


Figura 44. Efecto del enriquecimiento ambiental durante el periodo de interrupción. EAM, enriquecimiento ambiental; AES, alojamiento estándar.

Cada barra representa la media \pm S.E.M de 7-9 animales. Los datos se analizaron con un ANOVA de dos vías y Dunnett. * $p < 0.05$, en comparación con la máxima retención (48 h), # $p < 0.05$ grupos en EAM vs AES a las 216 h

6.8.3 Efecto del enriquecimiento ambiental y 8-OH-DPAT sobre la recuperación de la memoria

La figura 45 corresponde al efecto de la administración i.p. de 8-OH-DPAT (0.031 mg/kg) y el posterior alojamiento en EAM durante el periodo de interrupción. El grupo al que se le administró 8-OH-DPAT 0.031 mg/kg y posteriormente estuvo 3 horas por día en EAM mejoró la recuperación de la memoria (Tukey, $p < 0.05$). El análisis estadístico de ANOVA de dos vías indicó lo siguiente: para el tratamiento [$F_{6,96}=2.22$, $p=0.048$]; para el tiempo [$F_{1,96}=0.22$, $p=0.641$] y para la interacción [$F_{6,96}=2.22$, $p=0.048$].

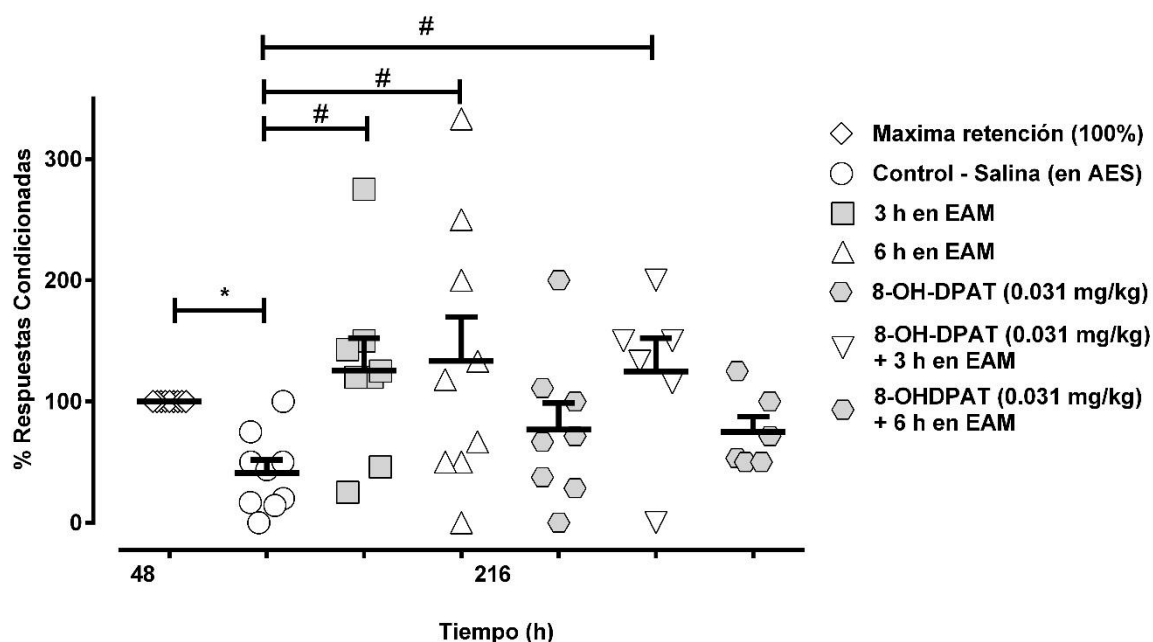


Figura 45. Efecto de 8-OH-DPAT y el enriquecimiento ambiental. EAM, enriquecimiento ambiental; AES, alojamiento estándar.

Cada barra representa la media \pm S.E.M de 6-9 animales. Los datos se analizaron con un ANOVA de dos vías y Tukey. * $p < 0.05$, en comparación con la máxima retención (48 h), # $p < 0.05$ grupos con tratamiento vs AES a las 216 h

6.9 Análisis de Microarreglos

El análisis de resultados de la hibridización de un microarreglo se puede dividir en dos: análisis estadístico, para identificar los genes expresados diferencialmente en el experimento y análisis bioinformático, donde los genes identificados se asocian con algún proceso biológico o función molecular (Ramirez et al., 2014).

El análisis estadístico fue proporcionado por la Unidad de Microarreglos de la UNAM. Sin embargo, previo al análisis estadístico, se obtienen imágenes digitales de la lectura de un microarreglo, estas imágenes están coloreadas artificialmente con software para realizar el análisis de imágenes (Ramirez et al., 2014).

La figura 46 corresponde a un chip de microarreglo donde se comparó G1, grupo control que no tuvo recuperación de memoria (216 h), con G3, grupo de máxima retención (48 h). Los puntos rojos representan a los genes que se expresan más en G1 que en G3, mientras que los puntos verdes son genes que se expresan más en G3 que en G1 y, por último, los puntos amarillos son genes que no cambian. La imagen de la derecha es el chip completo mientras que la imagen de la izquierda es sólo una parte de él con zoom.

La figura 47 muestra un chip de microarreglos donde se compararon los grupos G1, grupo control que no tuvo recuperación de memoria (216 h), con G2, grupo que mejoró la recuperación de memoria con WAY 100635 (216 h). Los puntos rojos son los genes que se expresan más en G1 que en G2, los puntos verdes son genes que se expresan más en G2 que en G1 y por último, los puntos amarillos son genes que no cambian.

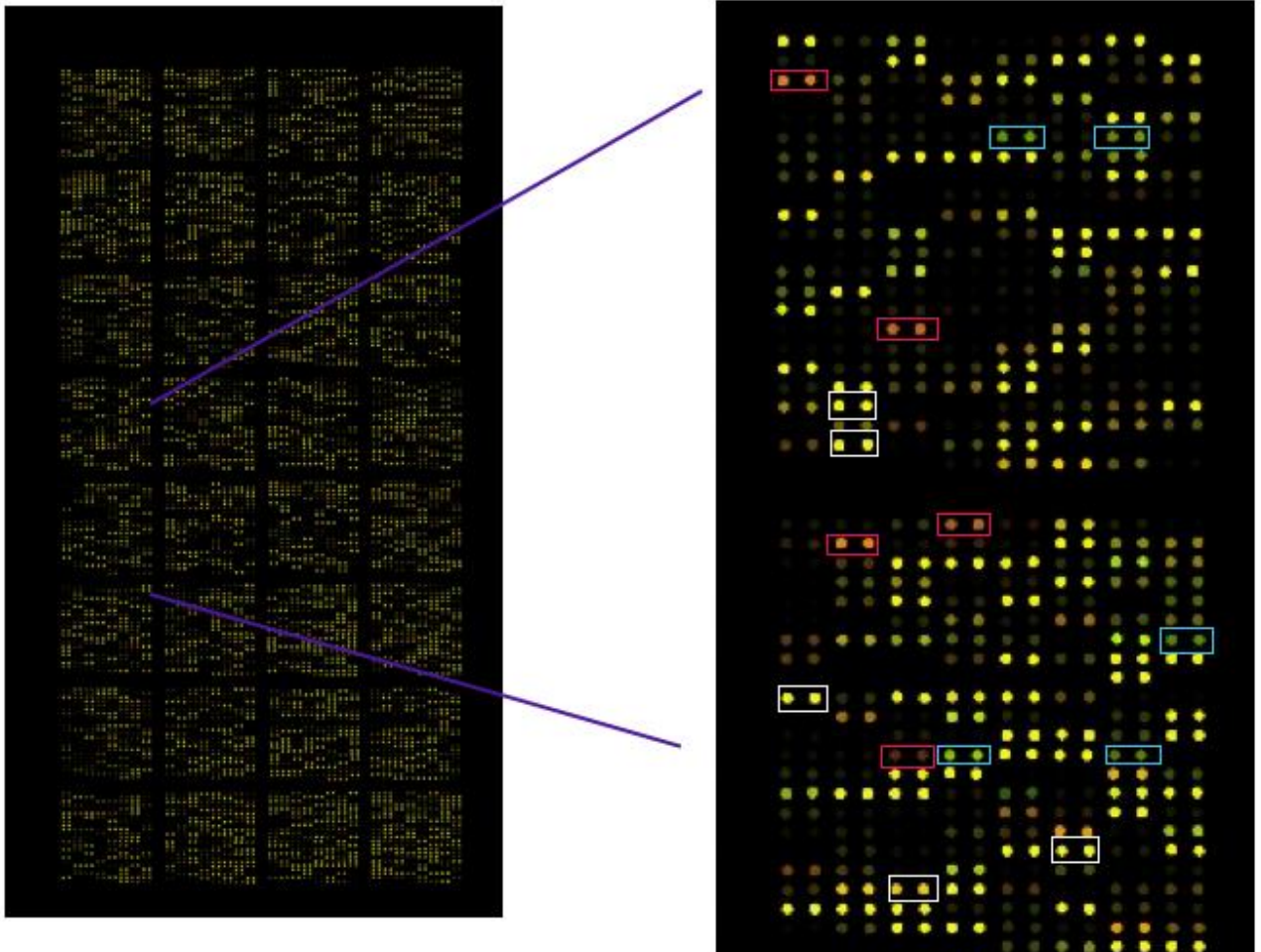


Figura 46. Chip de microarreglo donde se comparó G1, grupo control que no tuvo recuperación de memoria (216 h) con G3, grupo de máxima retención (48 h).

Puntos rojos: expresión de genes en G1 > G3, puntos verdes: expresión de genes G3 > G1, puntos amarillos: expresión de genes que no cambia.

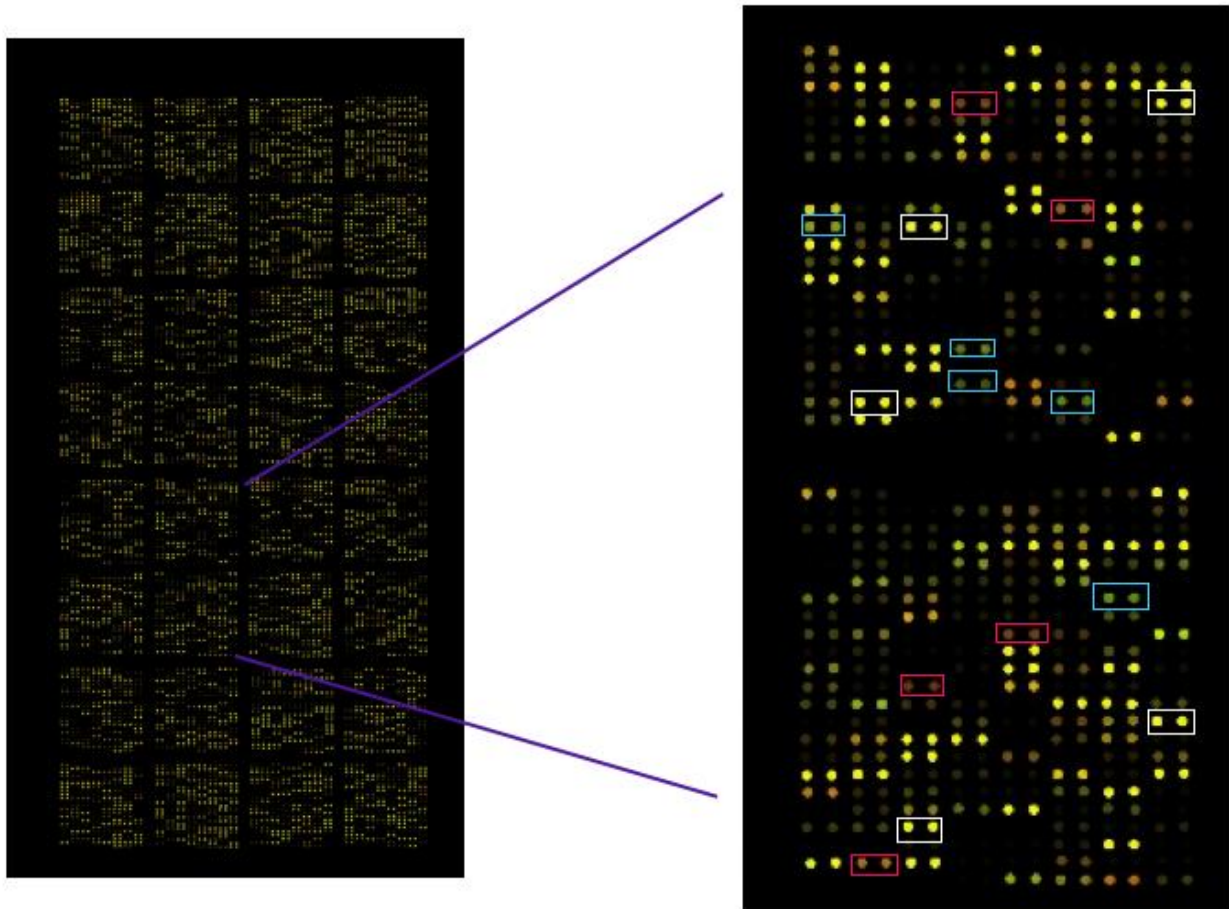


Figura 47. Chip de microarreglos donde se comparan los grupos G1, grupo control que no tuvo recuperación de memoria (216 h), con G2, grupo que mejoró la recuperación de memoria con WAY 100635 (216 h).

Puntos rojos: expresión de genes en $G1 > G2$, puntos verdes: expresión de genes $G2 > G1$, puntos amarillos: expresión de genes que no cambia.

6.9.1 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se emplea el Valor de Z.

Valor de Z. Es una prueba simple y funcional que utiliza el valor de la desviación estándar de la intensidad de señal calculado para cada individuo con relación a la de sus vecinos.

$$z_i = (R_i - \text{media}(R)) / ds(R)$$

z_i es el valor de Z para cada individuo.

R_i es el logaritmo de la relación del valor de intensidad de señal obtenido para el experimento entre el valor del control.

$ds(R)$ es la desviación estándar del logaritmo de esa relación.

En función de lo anterior, los resultados, mostrados en la tabla 5, se interpretarán de acuerdo a:

- Genes con el valor de Z mayor a 2 se considera que existe un cambio estadísticamente significativo entre la condición experimental y el control (genes con mayor expresión).
- Para valores menores que -2 (genes con menor expresión).

Tabla 5 Genes expresados	
	Número de genes
Máxima retención (48h) vs pérdida de memoria (216h)	
Genes que se expresan a la alta $z > 2$	95
Genes que se expresan a la alta $z > 1.5$	328
Genes que se expresan a la baja $z > 2$	169
Genes que se expresan a la baja $z > 1.5$	375
Pérdida de memoria (216h) vs Recuperación de la memoria (216h)	
Genes que se expresan a la alta $z > 2$	130
Genes que se expresan a la alta $z > 1.5$	335
Genes que se expresan a la baja $z > 2$	128
Genes que se expresan a la baja $z > 1.5$	365

6.9.2 Análisis bioinformático

Es importante resaltar que este tipo de experimentos, generan resultados para cientos e incluso miles de genes que modifican sus niveles de expresión en una condición determinada. Por ello la interpretación del resultado de un experimento requiere del “Análisis Bioinformático”, que puede ser definido como la

anotación de conjuntos de genes en bases de datos para vías metabólicas, procesos biológicos, función molecular, componente celular, ortología, etc. (Ramirez et al., 2014)

La base de datos que empleamos para el análisis bioinformático fue “DAVID Bioinformatics Resources 6.8, NIAID/NIH (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>). Los resultados que obtuvimos se presentan continuación.

Cuando se compara el grupo G3, que corresponde a un grupo que llegó hasta la máxima retención (48 h) y el grupo G1, que corresponde a un grupo que presentó pérdida de memoria (216h); las vías de señalización que se modifican en función de los genes que cambiaron su expresión de manera significativa son las siguientes:

➤ **G1 Vs G3 up > 2.**

- Vía de adhesión focal
- Vía miocardiopatía hipertrófica (MCH)
- Vía miocardiopatía dilatada
- Vía de Potenciación a largo plazo
- Vía de señalización PPAR
- Vía de contracción del músculo cardíaco

➤ **G1 Vs G3 down > 2**

- Migración transendotelial de leucocitos
- Vía de señalización de quimioquinas.
- Vía de señalización Fc epsilon RI
- Vía de cáncer colorrectal
- Vía de Apoptosis

Cuando se hace más flexible en análisis, esto es permitiendo una evaluación donde el valor de Z sea >1.5, las vías de señalización que se modifican son las siguientes:

➤ **G1 Vs G3 up > 1.5**

- Vía de señalización MAPK

- Adhesión focal
- Cascadas de complemento y coagulación
- Cáncer colonrectal
- Vías en el cáncer
- Miocardiopatía hipertrófica (MCH)
- Miocardiopatía dilatada
- Vía de señalización adipocitocina
- Vía de señalización de calcio
- Vía de señalización PPAR
- Linaje de células hematopoyéticas
- Interacción citocina-receptor de citocinas
- Vía de señalización de la quimioquina
- Cáncer de pulmón de células pequeñas
- Depresión a largo plazo
- Interacción neuroactiva ligando-receptor
- Melanoma
- Vía de señalización Fc epsilon RI
- Contracción del músculo cardíaco

➤ **G1 Vs G3 down > 1.5**

- Vía de señalización de la quimiocina
- Diabetes mellitus tipo II
- Cáncer colonorectal
- Regulación del citoesqueleto de actina
- Migración transendotelial de leucocitos
- Metabolismo de fármacos
- Vías en el cáncer
- Vía de señalización MAPK
- Vía de señalización de calcio
- Linaje de células hematopoyéticas
- Esclerosis lateral amiotrófica (ELA)

- Apoptosis
- Vía de señalización ErbB
- Adhesión focal
- Fagocitosis mediada por Fc gamma R
- Miocardiopatía dilatada

Mientras que, al comparar el grupo G2, que corresponde a un grupo fue administrado con WAY 100635 y que mejoró la recuperación de la memoria a las 216 h, y el grupo G1, que corresponde a un grupo que perdió la memoria (216h); las vías de señalización que se modifican en función de los genes que cambiaron su expresión de manera significativa son las siguientes:

- **G1 Vs G2 up. 2.0**
 - Unión estrecha
- **G1 Vs G2 down 2.0**
 - Vía de señalización de la neurotrofina

Cuando ampliamos el rango de Z a $Z > 1.5$, las vías de señalización que se modifican son las siguientes:

- **G1 Vs G2 up > 1.5**
 - Vía de señalización de calcio
 - Interacción neuroactiva ligando-receptor
 - Vía de señalización MAPK
 - Depresión a largo plazo
 - Vía de señalización adipocitocina
 - Adhesión focal
 - Cáncer colonrectal
 - Vía de señalización de la quimiocina
 - Melanoma
 - Vía de señalización PPAR

- Cáncer de pulmón de células no pequeñas
 - Cáncer de tiroides
 - Interacción citocina-receptor de citocinas
 - Vía de señalización ErbB
 - Vías en el cáncer
 - Glioma
 - Cáncer de prostata
 - Potenciación a largo plazo
 - Vía de señalización del receptor de células B
 - Vía de señalización Wnt
 - Cáncer endometrial
- **G1 Vs G2 down > 1.5**
- Contracción del músculo cardíaco
 - Cáncer colonorectal
 - Enfermedades priónicas
 - Vía de señalización ErbB
 - Glioma
 - Procesamiento y presentación de antígenos
 - Depresión a largo plazo
 - Metabolismo de triptófano
 - Carcinoma de células renales
 - Melanoma
 - Vía de señalización de neurotrofina

7 Discusión

7.1 Formación y recuperación de memoria

En este trabajo, observamos varios efectos importantes: (1) la formación progresiva de memoria; (2) el deterioro de la memoria después de siete días (168 h, tiempo entre la máxima retención a las 48 h y la última prueba a las 216 h); (3) el precursor metabólico L-triptófano (100 mg / kg) revirtió el deterioro de la memoria producido por el tiempo; (4) 8-OH-DPAT y LP 211 mejoraron la recuperación de la memoria, así como WAY 100635; (5) el enriquecimiento ambiental (EAM) mejoró la recuperación de la memoria cuando se implementa durante el periodo de interrupción; y (6) el análisis de microarreglos nos permitió identificar el número de genes que se expresan y suprimen, así como las vías de señalización afectadas cuando se pierde o recupera la memoria. La formación y el deterioro de la memoria dependen del tiempo. Sin embargo, la recuperación de la memoria es un proceso más complejo y depende de más variables, tales como la cantidad de retención y la eficiencia en la consolidación de la memoria. Una de las características principales y básicas dentro de los procedimientos de la prueba de automoldeamiento incluye que el animal aprenda la respuesta condicionada (RC) por sí mismo sin un entrenamiento previo; otro aspecto importante es que la mayoría de los animales aprenden el estímulo condicionado (EC) antes de acercarse al comedero en al menos algunos ensayos, mientras que otros animales adquieren la tendencia a hacerlo en casi todos los ensayos (Myhrer, 2003; Naeem & White, 2016; Quillfeldt, 2015). En los procedimientos típicos de autoformación, clásicos o pavlovianos, las respuestas del animal no influyen en el programa de entrega del reforzador (es decir, el alimento) (Brown & Jenkins, 1968). Utilizando este modelo, exploramos las bases farmacológicas de la recuperación de la memoria con especial énfasis en el estudio de la participación de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇, así como el efecto enriquecimiento ambiental (EAM).

7.2 Recuperación de la memoria y L-triptófano

La administración de L-triptófano aumentó parcial (50 mg/kg) o significativamente (100 mg/kg) el %RC respecto al grupo control de solución salina

produciendo una mejora en la recuperación de la memoria. Se ha reportado que la administración aguda de L-triptófano aumenta los niveles extracelulares de 5-HT, mismos que vuelven a niveles basales después de 160 min (Manjarrez et al., 2005; Meeusen et al., 1996). Como el deterioro de la memoria es un proceso dependiente del tiempo, probablemente la extinción de la memoria se acompaña de niveles bajos de L-triptófano, ya que el agotamiento agudo de L-triptófano afectó la memoria (por ejemplo, en una prueba de reconocimiento de objetos) (Jans et al., 2010; Lieben et al., 2004). Estos resultados sugieren que el efecto del L-triptófano en la recuperación de la memoria está relacionado con el aumento de los niveles de 5-HT en todo el cerebro. Se ha reportado que el aumento en la ingesta de triptófano va seguido de un aumento en la concentración plasmática de triptófano y el consecuente aumento en la concentración de 5-HT en el cerebro. Dichos efectos se acompañan de la mejora en la memoria espacial (evaluada con la prueba de laberinto radial) y la memoria a corto y largo plazo (con las pruebas de evitación pasiva y laberinto radial de Morris) (Khaliq et al., 2006; Ikram et al., 2014). Es cierto que se necesitarían más estudios de cuantificación de 5-HT, que quedan fuera del alcance de la presente investigación, para confirmar estos resultados. A continuación, estudiamos los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇ por los que la 5-HT muestra la mayor afinidad (Tabla 1).

7.3 Recuperación de la memoria y el receptor 5-HT_{1A}

La activación y bloqueo de los receptores 5-HT_{1A} mejoraron la recuperación de la memoria a largo plazo, lo que demuestra la participación potencial de estos receptores durante este proceso. El efecto de WAY 100635 sobre la recuperación de la memoria podría deberse a que los autorreceptores 5-HT_{1A} al estar bloqueados pueden promover un aumento de 5-HT. De acuerdo con lo anterior, observamos que el L-triptófano produjo un efecto similar. Ciertamente, el 8-OH-DPAT muestra una afinidad moderada por los receptores 5-HT₇ (Tabla 3) pero, no podemos excluir categóricamente la activación de estos receptores por este agonista. Además, la mejora de la recuperación de la memoria por 8-OH-DPAT fue eliminada en la coadministración de 8-OH-DPAT (0.031 o 0.062 mg/kg) + WAY 100635 (0.3 o 0.6

mg/kg). Aunque no tenemos una explicación clara de estos hallazgos, se puede sugerir que el 8-OH-DPAT pudo haber activado a los receptores 5-HT₇ que, a su vez, pudieron internalizar los autorreceptores 5-HT_{1A}, como se demostró previamente (Renner et al., 2012).

7.4 Recuperación de la memoria y el receptor 5-HT₇

Nuestros hallazgos indican que la activación del receptor 5-HT₇ mejora la recuperación de la memoria. Por otro lado, el antagonista selectivo del receptor 5-HT₇, SB 269970, y el no selectivo (5-HT_{2A/7}) LY 215840 no tuvieron efecto por sí mismos sobre la recuperación de la memoria. Sin embargo, la participación del receptor 5-HT₇ se evidenció cuando el SB 269970 revirtió el efecto facilitador del LP 211 sobre la recuperación de la memoria. Se encontró reportado que ratones deficientes del receptor 5-HT₇ mostraron puntuaciones más bajas en tareas de memoria conductual como el condicionamiento al miedo y la memoria de castigo; sin embargo, según los autores, no hubo coherencia en la dirección de los efectos conductuales entre los genotipos o los ensayos (Balcer et al., 2019). Además, se ha reportado que el SB 269970 (3.0 y 10.0 mg/kg, s.c.), con un retraso de 2 o 4 h, afectó la discriminación del objeto nuevo (es decir, disminuyó la recuperación de memoria) (Freret et al., 2014). Curiosamente, los ratones tratados con el agonista del receptor 5-HT_{1/7}, 5-carboxamidotriptamina (1.0 mg/kg), mostraron una discriminación significativa (recuperación de memoria), que fue bloqueada por SB 269970 (10.0 mg/kg). Los autores concluyeron que la activación del receptor 5-HT₇ modula los procesos cognitivos implicados en el reconocimiento de objetos (Freret et al., 2014).

7.5 Recuperación de la memoria y la interacción entre los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇

Para continuar investigando la participación de cada receptor en la recuperación de la memoria, se estudió el efecto de cada agonista de 5-HT_{1A} y 5-HT₇ en presencia del antagonista del otro receptor 5-HT_{1A} o 5-HT₇ por medio de una administración conjunta. Los resultados mostraron que la co-administración de

antagonistas del receptor 5-HT₇ y 5-HT_{1A} junto al agonista de 5-HT_{1A} no modificó el efecto facilitador en la recuperación de la memoria producido por sólo el agonista de 5-HT_{1A} (Fig. 38). Por el contrario, las combinaciones entre antagonistas de 5-HT_{1A} y 5-HT₇ y agonistas de 5-HT_{1A} y 5-HT₇ anularon el aumento en la recuperación de la memoria que WAY 100635 y 8-OH-DPAT produjeron de manera individual. Estos hallazgos indican que los efectos mediados por el receptor 5-HT_{1A} prevalecieron probablemente debido al aumento en el tono serotoninérgico evidenciado por la inactivación del receptor 5-HT_{1A} por por WAY 100635 o la activación de 8-OH-DPAT. Es importante destacar que el curso temporal (0-120 h) de la memoria progresiva mostró que la expresión del ARNm de los receptores 5-HT_{1A} o 5-HT₇ aumenta y disminuye monotónicamente en la corteza prefrontal, hipocampo y los núcleos de rafé, respectivamente (Perez-Garcia & Meneses, 2009), lo que indica que durante la máxima retención (48 h), puede haberse producido una mayor expresión del receptor 5-HT_{1A} y una menor expresión de los receptores 5-HT₇. Nuestros resultados sugieren que los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇ interactúan durante el proceso de pérdida de memoria. Esta hipótesis se confirmó con la observación de que al bloquear simultáneamente los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇ y estimular específicamente receptor 5-HT₇ no se modificó la pérdida de memoria. Estos sugiere que la activación del receptor 5-HT₇ por sí sola no es suficiente para mejorar la recuperación de la memoria. Se ha demostrado que los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇ forman heterodímeros que mejoran las propiedades de internalización y señalización del receptor 5-HT_{1A} cuando se activan los receptores 5-HT₇ (Renner et al., 2012). En contraste, el bloqueo de ambos receptores simultáneo a la estimulación del receptor 5-HT_{1A} mejoró la recuperación de la memoria, lo que sugiere que los receptores 5-HT_{1A} presinápticos desempeñan un papel destacado para mejorar la recuperación de la memoria.

La existencia aparente de actividad constitutiva del receptor 5-HT₇ hace que cualquier evaluación del tono del receptor 5-HT₇ sea problemática (Balcer et al., 2019; Witkin et al., 2007). Sin embargo, como ya se mencionó, la pérdida de la memoria es un proceso natural que ocurre de manera normal en la vida (Davis & Zhong, 2017; Gold & Korol, 2014), como se replicó en el presente trabajo. En este

sentido, van Praag (2004) planteó la hipótesis de que en el trastorno de estrés postraumático (TEPT), una característica inicial es la regulación a la baja del receptor 5-HT_{1A} (H. M. Van Praag, 2004) y considerando que la heterodimerización de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇ regula de manera diferencial la señalización y el tráfico de los receptores (Renner et al., 2012; Rojas et al., 2017), probablemente, los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇ podrían ser blancos terapéuticos para mejorar la memoria. Por último, la estimulación de la 5-HT es constante, lo que resulta en un mayor nivel de AMPc que conduce a formas de plasticidad sináptica más duraderas (por ejemplo, aprendizaje y memoria) (Kandel, 2012; Perez-García & Meneses, 2008).

7.6 Posible mecanismo de acción

Se propone el siguiente mecanismo de acción en función de los resultados obtenidos por la activación de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇: la 5-HT podría actuar como un neuromodulador en las neuronas del hipocampo. Por ejemplo, la activación de los autorreceptores 5-HT_{1A} acoplados a Gi/o reduce los niveles de 5-HT en la hendidura sináptica. Además, la activación del receptor 5-HT_{1A} inhibió la inducción de LTP porque redujo las corrientes de calcio y aumentó las corrientes de potasio, este efecto se produjo al administrar el agonista de 5-HT_{1A} inmediatamente después de la última sesión de aprendizaje, por lo que se impidió la consolidación de la memoria a largo plazo. Sin embargo, el efecto de 8-OH-DPAT, un agonista de 5-HT_{1A}, sobre la memoria depende de las dosis administradas. A dosis bajas, el 8-OH-DPAT tiene un efecto precognitivo, mientras que las dosis altas tienen un efecto deletéreo sobre la formación de la memoria. Este efecto bifásico podría deberse a la activación de los receptores 5-HT_{1A} presinápticos (dosis bajas) y postsinápticos (dosis altas), como se observó previamente en la retención de evitación pasiva (Madjid et al., 2006). Por otro lado, la activación de los receptores 5-HT₇ podría activar varias vías de señalización intracelular que activan la transcripción de genes, el crecimiento de neuritas y la sinaptogénesis, tales como: (1) proteína G_s que podría activar cAMP-PAK-Ras-AKT/ERK; o (2) proteína G_{α12} que resulta en la estimulación de la activación de factores de transcripción dependiente de Rho

(Kvachnina et al., 2005). Esto, a su vez, podría potenciar la formación de espinas dendríticas, aumentar la excitabilidad neuronal y la plasticidad (Kobe et al., 2012). En este contexto, la activación de los receptores 5-HT₇: (1) promueve la actividad del receptor NMDA (Vasefi et al., 2013); y (2) aumenta la fosforilación de la subunidad A1 del receptor AMPA (Andreetta et al., 2016); estos eventos aumentan la potenciación a largo plazo, un mecanismo de plasticidad sináptica que se sugiere como la base de la persistencia de la memoria.

7.7 Recuperación de la memoria y la región CA1 del hipocampo

Nuestros resultados mostraron que la administración intrahipocampal de 8-OH-DPAT (agonista a 5-HT_{1A}) y WAY 100635 (antagonista de 5-HT_{1A}), así como del agonista de receptores 5-HT₇, LP 211, no tuvieron efecto sobre la recuperación de la memoria. La administración en CA1, se propuso de acuerdo al circuito clásico de memoria en el hipocampo. Como se describió previamente, en el hipocampo, una de las proyecciones secuenciales para la consolidación de la memoria va desde la CE a giro dentado (DG), CA3, y luego a CA1 (Yau et al., 2015). Al ser la región CA1 la última área por la que pasa la información antes de ser almacenada, la administración de los fármacos en CA1 reforzaría la consolidación de la memoria, sin embargo, esto no ocurrió. En la literatura encontramos reportado que el circuito directo de CA1 a CE es esencial para la formación de la memoria del hipocampo. Sin embargo, se ha propuesto al subículo (sub) como el área dedicada a cumplir con los requisitos asociados con la recuperación, por medio del circuito CA1–Sub–CE (Roy et al., 2017). Por lo tanto, la activación del subículo sería necesaria para la recuperación y actualización rápida de la memoria del hipocampo (Roy et al., 2017).

7.8 Recuperación de la memoria y el enriquecimiento ambiental

El efecto principal del EAM se obtuvo cuando este tipo de alojamiento se implementó durante el periodo de interrupción (después de la máxima retención a las 48 h). Este tipo de tratamiento no farmacológico mejoró la recuperación de la memoria. En estudios previos se ha reportado que el EAM está relacionado con efectos celulares como la plasticidad sináptica y neurogénesis en el giro dentado

del hipocampo, lo que indica que las neuronas nuevas pueden tener un papel funcional en la mejora en el aprendizaje y memoria (Laviola et al., 2008; Patel, 2012; Segovia et al., 2006; Tran et al., 2019; H. van Praag et al., 2000). De acuerdo con esto, el EAM podría estar mejorando la neurogénesis y de esta manera facilitando la posterior recuperación de la memoria.

Por otro lado, el EAM previo al protocolo experimental no tuvo efecto sobre la recuperación de la memoria. En este sentido, en modelos computacionales se ha establecido que la adición de neuronas degrada los recuerdos existentes (es decir, produce deterioro de la memoria). Estas predicciones están respaldadas por observaciones empíricas en roedores, donde el aumento en exceso en la neurogénesis posterior a un entrenamiento promueve la pérdida de los recuerdos dependientes del hipocampo (Tran et al., 2019).

Por último, en la literatura encontramos reportado que la administración de buspirona 0.1 mg/kg, un agonista del receptor 5-HT_{1A}, junto con el enriquecimiento ambiental mejora la adquisición de aprendizaje espacial y la retención de memoria, al mismo tiempo que atenúa el daño histológico de ratas macho de 17 días de edad postnatal a las que les fue realizada una lesión cerebral traumática (TBI), lo que sugiere que el efecto es aditivo (Monaco et al. 2014). Sin embargo, cuando nosotros combinamos el tratamiento farmacológico (8-OH-DPAT) con el EAM, no observamos el efecto coadyuvante que esperábamos. Esto podría deberse a que probamos el tiempo en EAM y la dosis efectiva, que por sí solas mejoraban cada una la recuperación de la memoria.

7.9. Recuperación de la memoria y microarreglos

Los resultados mostraron vías de señalización modificadas durante las diferentes condiciones que se estudiaron. Esto podría denotar cómo una condición, en este caso el aprendizaje y memoria, puede involucrar o modificar diversos procesos fisiológicos de manera simultánea. Algunas vías que se activaron cuando se mejoró la recuperación de memoria fueron 1) la vía de señalización de calcio, que se activa por los receptores 5-HT_{2B}, 5-HT_{5A} y 5-HT₇; y 2) la vía de LTP, que podría revelar que este proceso es dependiente del bloqueo de los receptores 5-

HT_{1A}. Ambas vías se expresaron en los microarreglos cuando se administró el antagonista a 5-HT_{1A}, por lo que se sugiere la participación de este receptor en la recuperación de la memoria.

Sin embargo, en pocos casos los microarreglos pueden servir como experimentos comprobatorios o concluyentes, por lo que es necesario realizar otras pruebas moleculares para una interpretación más clara acerca de la participación de 5-HT_{1A} y 5-HT₇ en la formación y recuperación de memoria.

8. Conclusiones

- 1) El presente estudio muestra que la recuperación de la memoria parece ser un proceso que requiere la activación de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇ y el bloqueo de los receptores 5-HT_{1A}. Hasta donde sabemos, éste es el primer estudio que muestra la participación potencial de ambos receptores en el proceso de recuperación de la memoria.
- 2) Los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇ de la región CA1 del hipocampo no participan en la recuperación de la memoria.
- 3) El enriquecimiento ambiental mejora la recuperación de la memoria cuando se implementa después de la formación de la memoria a largo plazo.
- 4) Los microarreglos indicaron la activación de algunas vías de señalización dependientes de calcio y de potenciación a largo plazo, ambas asociadas con la recuperación de la memoria.

9. Perspectivas

- Estudiar el efecto de agonistas con más afinidad al receptor 5-HT₇, por ejemplo, LP 44, $k_i=0.22$ nM o LP 12 $k_i= 0.13$ nM.
- Evaluar el efecto de agonistas y antagonistas de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇ durante el periodo de interrupción (administración diaria).
- Medir la expresión de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇ y cuantificar los niveles de AMPc durante el periodo de interrupción y después de la recuperación de la memoria. De esta manera podríamos elucidar qué receptor está teniendo efecto sobre la recuperación de la memoria. Ya que sólo el receptor 5-HT₇ activa la vía de AC.
- Estandarizar el tiempo en enriquecimiento ambiental previo al protocolo de experimentación con el objetivo de establecer si puede servir como un tratamiento preventivo.
- Estudiar el efecto de agonistas y antagonistas de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇ en la corteza prefrontal y/o subículo, áreas que, de acuerdo a la bibliografía, tienen mayor relevancia en la recuperación de la memoria.

10. Referencias bibliográficas

- Adriani, W., Travaglini, D., Lacivita, E., Saso, L., Leopoldo, M., & Laviola, G. (2012). Modulatory effects of two novel agonists for serotonin receptor 7 on emotion, motivation and circadian rhythm profiles in mice. *Neuropharmacology*, 62(2), 833–842. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.09.012>
- Albert, P. R., & Lemonde, S. (2004). 5-HT_{1A} receptors, gene repression, and depression: guilt by association. *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 10(6), 575–593. <https://doi.org/10.1177/1073858404267382>
- Anderson, M. C., Ochsner, K. N., Kuhl, B., Cooper, J., Robertson, E., Gabrieli, S. W., Glover, G. H., & Gabrieli, J. D. (2004). Neural systems underlying the suppression of unwanted memories. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5655), 232–235. <https://doi.org/10.1126/science.1089504>
- Andrade, R., Barnes, N. M., Baxter, G., Bockaert, J., Branchek, T., Butler, A., Yocca, F. (2019). 5-Hydroxytryptamine receptors (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. *IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE*, 2019(4). <https://doi.org/10.2218/gtopdb/f1/2019.4>
- Balcer, O. M., Seager, M. A., Gleason, S. D., Li, X., Rasmussen, K., Maxwell, J. K., Witkin, J. M. (2019). Evaluation of 5-HT₇ receptor antagonism for the treatment of anxiety, depression, and schizophrenia through the use of receptor-deficient mice. *Behavioural Brain Research*, 360, 270–278. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.12.019>
- Barnes, N. M., Ahern, G. P., Becamel, C., Bockaert, J., Camilleri, M., Chaumont-Dubel, S., Claeysen, S., Cunningham, K. A., Fone, K. C., Gershon, M., Di Giovanni, G., Goodfellow, N. M., Halberstadt, A. L., Hartley, R. M., Hassaine, G., Herrick-Davis, K., Hovius, R., Lacivita, E., Lambe, E. K., Leopoldo, M., ... Hoyer, D. (2021). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CX. Classification of Receptors for 5-hydroxytryptamine; Pharmacology and Function. *Pharmacological reviews*, 73(1), 310–520. <https://doi.org/10.1124/pr.118.015552>

- Bauer, P. J. (2013). Memory Development. *Neural Circuit Development and Function in the Healthy and Diseased Brain* (Vol. 3). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397267-5.00040-6>
- Benarroch E. E. (2018). Glutamatergic synaptic plasticity and dysfunction in Alzheimer disease: Emerging mechanisms. *Neurology*, 91(3), 125–132. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000005807>
- Berger, M., Gray, J. A., & Roth, B. L. (2009). The Expanded Biology of Serotonin. *Annual Review of Medicine*, 60(1), 355–366. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.60.042307.110802>
- Bizon, J. L. (2005). More Is Less: Neurogenesis and Age-Related Cognitive Decline in Long-Evans Rats. *Science of Aging Knowledge Environment*, 2005(7), re2–re2. <https://doi.org/10.1126/sageke.2005.7.re2>
- Bliss, T. V. P., & 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), 331–356. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1973.sp010273>
- Borg, J. (2008). Molecular imaging of the 5-HT_{1A} receptor in relation to human cognition. *Behavioural Brain Research*, 195(1), 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.06.011>
- Brown, P. L., & Jenkins, H. M. (1968). Auto-Shaping of the Pigeon'S Key-Peck 1. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 11(1), 1–8. <https://doi.org/10.1901/jeab.1968.11-1>
- Cammarota, M., Barros, D. M., Vianna, M. R., Bevilaqua, L. R., Coitinho, A., Szapiro, G., Izquierdo, L. A., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2004). The transition from memory retrieval to extinction. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 76(3), 573–582. <https://doi.org/10.1590/s0001-37652004000300011>
- Castellucci, V., & Kandel, E. R. (1976). Presynaptic facilitation as a mechanism for behavioral sensitization in *Aplysia*. *Science*, 194(4270), 1176–1178. <https://doi.org/10.1126/science.111560>

- Cavallaro S. (2008). Genomic analysis of serotonin receptors in learning and memory. *Behavioural brain research*, 195(1), 2–6. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.12.003>
- Corcoran, K. A., & Maren, S. (2001). Hippocampal inactivation disrupts contextual retrieval of fear memory after extinction. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(5), 1720–1726. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-05-01720.2001>
- Cushing, D. J., Zgombick, J. M., Nelson, D. L., & Cohen, M. L. (1996). LY215840, a high-affinity 5-HT₇ receptor ligand, blocks serotonin-induced relaxation in canine coronary artery. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 277(3).
- Davis, R. L., & Zhong, Y. (2017). The Biology of Forgetting—A Perspective. *Neuron*, 95(3), 490–503. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.05.039>
- Deng, W., Aimone, J. B., & Gage, F. H. (2010). New neurons and new memories: How does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nature Reviews Neuroscience*, 11(5), 339–350. <https://doi.org/10.1038/nrn2822>
- Dudai, Y. (2002). *Memory from A to Z: Keywords, Concepts, and Beyond*.
- Dong, Z., Han, H., Li, H., Bai, Y., Wang, W., Tu, M., Peng, Y., Zhou, L., He, W., Wu, X., Tan, T., Liu, M., Wu, X., Zhou, W., Jin, W., Zhang, S., Sacktor, T. C., Li, T., Song, W., & Wang, Y. T. (2015). Long-term potentiation decay and memory loss are mediated by AMPAR endocytosis. *The Journal of clinical investigation*, 125(1), 234–247. <https://doi.org/10.1172/JCI77888>
- Dudai, Yadin, Karni, A., & Born, J. (2015). The Consolidation and Transformation of Memory. *Neuron*, 88(1), 20–32. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.004>
- Dudai, Yadin. (2004). The Neurobiology of Consolidations, Or, How Stable is the Engram? *Annual Review of Psychology*, 55(1), 51–86. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.55.090902.142050>
- Dudai, Yadin. (2012). The Restless Engram: Consolidations Never End. *Annual Review of Neuroscience*, 35(1), 227–247. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-062111-150500>

- Eldridge, L. L., Knowlton, B. J., Furmanski, C. S., Bookheimer, S. Y., & Engel, S. A. (2000). Remembering episodes: a selective role for the hippocampus during retrieval. *Nature neuroscience*, 3(11), 1149–1152. <https://doi.org/10.1038/80671>
- Eriksson, T. M., Holst, S., Stan, T. L., Hager, T., Sjögren, B., Ögren, S. O., Stiedl, O. (2012). 5-HT1A and 5-HT7 receptor crosstalk in the regulation of emotional memory: Implications for effects of selective serotonin reuptake inhibitors. *Neuropharmacology*, 63(6), 1150–1160. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.06.061>
- Fernández-Pérez, S., Pache, D. M., & Sewell, R. D. E. (2005). Co-administration of fluoxetine and WAY100635 improves short-term memory function. *European Journal of Pharmacology*, 522(1–3), 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.08.039>
- Fernandez, S. P., Muzerelle, A., Scotto-Lomassese, S., Barik, J., Gruart, A., Delgado-García, J. M., & Gaspar, P. (2017). Constitutive and Acquired Serotonin Deficiency Alters Memory and Hippocampal Synaptic Plasticity. *Neuropsychopharmacology*, 42(2), 512–523. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.134>
- Freret, T., Paizanis, E., Beaudet, G., Gusmao-Montaigne, A., Nee, G., Dauphin, F., Boulouard, M. (2014). Modulation of 5-HT7 receptor: Effect on object recognition performances in mice. *Psychopharmacology*, 231(2), 393–400. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3247-x>
- Gasbarri, a, Cifariello, a, Pompili, a, & Meneses, a. (2008). Effect of 5-HT(7) antagonist SB-269970 in the modulation of working and reference memory in the rat. *Behav Brain Res*, 195(1), 164–170. [https://doi.org/S0166-4328\(07\)00673-0](https://doi.org/S0166-4328(07)00673-0) [pii]r10.1016/j.bbr.2007.12.020
- Gold, P. E., & Korol, D. L. (2014). Forgetfulness during aging: An integrated biology. *Neurobiology of Learning and Memory*. Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.03.005>

- National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. (2011). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. (8th ed.). National Academies Press (US).
- Guseva, D., Wirth, A., Ponimaskin, E., Perrone-Capano, C., & Beazely, M. A. (2014). Cellular mechanisms of the 5-HT₇ receptor-mediated signaling, 8(October), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00306>
- Hagan, J. J., Price, G. W., Jeffrey, P., Deeks, N. J., Stean, T., Piper, D., ... Thomas, D. R. (2000). Characterization of SB-269970-A, a selective 5-HT₇ receptor antagonist. *British Journal of Pharmacology*, 130(3), 539–548. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703357>
- Hedlund, P. B., Kelly, L., Mazur, C., Lovenberg, T., Sutcliffe, J. G., & Bonaventure, P. (2004). 8-OH-DPAT acts on both 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors to induce hypothermia in rodents. *European Journal of Pharmacology*, 487(1–3), 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.01.031>
- Hedlund, P. B., Leopoldo, M., Caccia, S., Sarkisyan, G., Fracasso, C., Martelli, G., Perrone, R. (2010). LP-211 is a brain penetrant selective agonist for the serotonin 5-HT₇ receptor. *Neuroscience Letters*, 481(1), 12–16. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.06.036>
- Hendricks, T. J., Fyodorov, D. V., Wegman, L. J., Lelutiu, N. B., Pehek, E. A., Yamamoto, B., Silver, J., Weeber, E. J., Sweatt, J. D., & Deneris, E. S. (2003). Pet-1 ETS gene plays a critical role in 5-HT neuron development and is required for normal anxiety-like and aggressive behavior. *Neuron*, 37(2), 233–247. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)01167-4](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)01167-4)
- Hensler, J. G. (2006). Serotonergic modulation of the limbic system. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 30(2), 203–214. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.06.007>
- Hensler, J. G. (2012). Serotonin. In *Basic Neurochemistry* (pp. 300–322). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374947-5.00015-8>
- Hoyer, D., Clarke, D. E., Fozard, J. R., Hartig, P. R., Martin, G. R., Mylecharane, E. J., Humphrey, P. P. A. (1994). VII. International Union of Pharmacology

- classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacological Reviews*, 46(2), 157–203.
- Ikram, H., Mushtaq, F., & Haleem, D. J. (2014). Dose-dependent effects of tryptophan on learning and memory. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27(5), 1131–1135. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.12.013>
- Izquierdo, I., & Medina, J. H. (1995). Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. *Neurobiology of learning and memory*, 63(1), 19–32. <https://doi.org/10.1006/nlme.1995.1002>
- Izquierdo, I., Medina, J. H., Vianna, M. R. M., Izquierdo, L. A., & Barros, D. M. (1999). Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behavioural Brain Research*, 103(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(99\)00036-4](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(99)00036-4)
- Izquierdo, I., Vianna, M. R. M., Izquierdo, L. a., Barros, D. M., Szapiro, G., Coitinho, A. S., Medina, J. H. (2002). Memory retrieval and its lasting consequences. *Neurotoxicity Research*, 4(5–6), 573–593. <https://doi.org/10.1080/10298420290031441>
- Jans, L. A. W., Korte-Bouws, G. A. H., Korte, S. M., & Blokland, A. (2010). The effects of acute tryptophan depletion on affective behaviour and cognition in Brown Norway and Sprague Dawley rats. *Journal of Psychopharmacology*, 24(4), 605–614. <https://doi.org/10.1177/0269881108099424>
- Kandel, E. R. (2001, November 2). The molecular biology of memory storage: A dialogue between genes and synapses. *Science*. American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.1067020>
- Kandel, Eric R. (2012). The molecular biology of memory: CAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB. *Molecular Brain*. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-5-14>
- Kandel, Eric R., Dudai, Y., & Mayford, M. R. (2014). The molecular and systems biology of memory. *Cell*, 157(1), 163–186. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.001>
- Kensinger, E. A., & Ford, J. H. (2020). Retrieval of Emotional Events from Memory. *Annual review of psychology*, 71, 251–272. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-010419-051123>

- Kobe, F., Guseva, D., Jensen, T. P., Wirth, A., Renner, U., Hess, D., Müller, M., Medrihan, L., Zhang, W., Zhang, M., Braun, K., Westerholz, S., Herzog, A., Radyushkin, K., El-Kordi, A., Ehrenreich, H., Richter, D. W., Rusakov, D. A., & Ponimaskin, E. (2012). 5-HT7R/G12 signaling regulates neuronal morphology and function in an age-dependent manner. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(9), 2915–2930. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2765-11.2012>
- Khaliq, S., Haider, S., Ahmed, S. P., Perveen, T., & Haleem, D. J. (2006). Relationship of brain tryptophan and serotonin in improving cognitive performance in rats. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences.*, 19(1), 11–15.
- Kim, J. J., & Fanselow, M. S. (1992). Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science*, 256(5057), 675–677. <https://doi.org/10.1126/science.1585183>
- Kitamura, T., & Inokuchi, K. (2014). Role of adult neurogenesis in hippocampal-cortical memory consolidation. *Molecular Brain* (Vol. 7). <https://doi.org/10.1186/1756-6606-7-13>
- Laviola, G., Hannan, A. J., Macrì, S., Solinas, M., & Jaber, M. (2008). Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. *Neurobiology of Disease*, 31(2), 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.05.001>
- Lesch, K. P., & Waider, J. (2012). Serotonin in the Modulation of Neural Plasticity and Networks: Implications for Neurodevelopmental Disorders. *Neuron*, 76(1), 175–191. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.013>
- Li, Y., Mu, Y., & Gage, F. H. (2009). Chapter 5 Development of Neural Circuits in the Adult Hippocampus. *Current Topics in Developmental Biology*, 87(09), 149–174. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(09\)01205-8](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(09)01205-8)
- Lieben, C. K., van Oorsouw, K., Deutz, N. E., & Blokland, A. (2004). Acute tryptophan depletion induced by a gelatin-based mixture impairs object memory but not affective behavior and spatial learning in the rat. *Behavioural brain research*, 151(1-2), 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2003.08.002>

- Liy-Salmeron, G., & Meneses, A. (2007). Role of 5-HT₁₋₇ receptors in short- and long-term memory for an autoshaping task: Intrahippocampal manipulations. *Brain Research*, 1147(1), 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.02.007>
- Lynch, M. A. (2004). Long-term potentiation and memory. *Physiological Reviews*, 84(1), 87–136. <https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2003>
- Manjarrez, G., Hernandez, E., Robles, A., & Hernández, J. (2005). N1/P2 component of auditory evoked potential reflect changes of the brain serotonin biosynthesis in rats. *Nutritional Neuroscience*, 8(4), 213–218. <https://doi.org/10.1080/10284150500170971>
- Martin, S. J., Grimwood, P. D., & Morris, R. G. M. (2000). Synaptic plasticity and memory: An Evaluation of the Hypothesis. *Annual Review of Neuroscience*, (Hebb 1949), 649–711. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.649>
- Mayford, M., Siegelbaum, S. A., & Kandel, E. R. (2012). Synapses and memory storage. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(6), 1–18. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005751>
- Meeusen, R., Thorré, K., Chaouloff, F., Sarre, S., De Meirleir, K., Ebinger, G., & Michotte, Y. (1996). Effects of tryptophan and/or acute running on extracellular 5-HT and 5-HIAA levels in the hippocampus of food-deprived rats. *Brain Research*, 740(1–2), 245–252. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(96\)00872-4](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(96)00872-4)
- Meneses, Alfredo, & Ponce-Lopez, T. (2014). Special issue: Potential therapeutic targets involving 5-HT₆ and 5-HT₇ receptors. *Reviews in the Neurosciences*, 25(3), 309–310. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2014-0020>
- Meneses, A., Perez-Garcia, G., Liy-Salmeron, G., Ponce-López, T., Lacivita, E., & Leopoldo, M. (2015). 5-HT₇ receptor activation: procognitive and anti-amnesic effects. *Psychopharmacology*, 232(3), 595–603. <https://doi.org/10.1007/s00213-014-3693-0>
- Meneses, Alfredo, & Terro, A. (2001). Role of 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors in the facilitatory response induced by 8-OH-DPAT on learning consolidation, 21, 21–28.

- Meneses, Alfredo. (2004). Effects of the 5-HT 7 receptor antagonists SB-269970 and DR 4004 in autoshaping Pavlovian/instrumental learning task. *Behavioural Brain Research*, 155(2), 275–282. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.04.026>
- Meneses, Alfredo. (2014). 5-HT7 receptor stimulation and blockade: a therapeutic paradox about memory formation and amnesia. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8(June), 5–8. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00207>
- Meneses, Alfredo. (2017). Frameworking memory and serotonergic markers. *Reviews in the Neurosciences*, 28(5), 455–497. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2016-0079>
- Millan, M. J., Agid, Y., Brüne, M., Bullmore, E. T., Carter, C. S., Clayton, N. S., Young, L. J. (2012). Cognitive dysfunction in psychiatric disorders: characteristics, causes and the quest for improved therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(2), 141–168. <https://doi.org/10.1038/nrd3628>
- Monaco, C. M., Gebhardt, K. M., Chlebowski, S. M., Shaw, K. E., Cheng, J. P., Henchir, J. J., Kline, A. E. (2014). A combined therapeutic regimen of buspirone and environmental enrichment is more efficacious than either alone in enhancing spatial learning in brain-injured pediatric rats. *Journal of Neurotrauma*, 31(23), 1934–1941. <https://doi.org/10.1089/neu.2014.3541>
- 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), 268–287. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(02\)00268-0](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(02)00268-0)
- Nadel, L., Hubbach, A., Gomez, R., & Newman-Smith, K. (2012). Memory formation, consolidation and transformation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36(7), 1640–1645. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.03.001>
- Naeem, M., & White, N. M. (2016). Parallel learning in an autoshaping paradigm. *Behavioral Neuroscience*, 130(4), 376–392. <https://doi.org/10.1037/bne0000154>
- Naumenko, V. S., Kondaurova, E. M., & Popova, N. K. (2011). On the role of brain 5-HT 7 receptor in the mechanism of hypothermia: Comparison with hypothermia mediated via 5-HT 1A and 5-HT 3 receptor. *Neuropharmacology*, 61(8), 1360–1365. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.08.022>

- Naumenko, V. S., Popova, N. K., Lacivita, E., Leopoldo, M., & Ponimaskin, E. G. (2014). Interplay between serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors in depressive disorders. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 20(7), 582–590. <https://doi.org/10.1111/cns.12247>
- Neves, G., Cooke, S. F., & Bliss, T. V. P. (2008). Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: A neural network approach to causality. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(1), 65–75. <https://doi.org/10.1038/nrn2303>
- Nikiforuk, A., Hołuj, M., Potasiewicz, A., & Popik, P. (2015). Effects of the selective 5-HT₇ receptor antagonist SB-269970 on premature responding in the five-choice serial reaction time test in rats. *Behavioural Brain Research*, 289, 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.04.030>
- Nithianantharajah, J., & Hannan, A. J. (2006). Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(9), 697–709. <https://doi.org/10.1038/nrn1970>
- Olivier, B. (2015). Serotonin: A never-ending story. *European Journal of Pharmacology*, 753, 2–18. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.10.031>
- Patel, T. R. (2012). Environmental enrichment: Aging and memory. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 85(4), 491–500.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2013). *The rat brain, in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press.
- Perez-García, G., & Meneses, A. (2008). Ex vivo study of 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptor agonists and antagonists on cAMP accumulation during memory formation and amnesia. *Behavioural Brain Research*, 195(1), 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.07.033>
- Perez-Garcia, G., & Meneses, A. (2009). Memory time-course: mRNA 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors. *Behavioural Brain Research*, 202(1), 102–113. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.03.027>
- Pérez-García, G., Gonzalez-Espinosa, C., & Meneses, A. (2006). An mRNA expression analysis of stimulation and blockade of 5-HT₇ receptors during memory consolidation. *Behavioural Brain Research*, 169(1), 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.12.013>

- Quevedo, J., Vianna, M. R., Martins, M. R., Barichello, T., Medina, J. H., Roesler, R., & Izquierdo, I. (2004). Protein synthesis, PKA, and MAP kinase are differentially involved in short- and long-term memory in rats. *Behavioural brain research*, 154(2), 339–343. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.03.001>
- Quillfeldt, J. A. (2015). Behavioral methods to study learning and memory in rats. In *Rodent Model as Tools in Ethical Biomedical Research* (pp. 271–311). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-11578-8_17
- Ramón y Cajal S. 1894. Croonian lecture. La fine structure des centres nerveux. *Proc R Soc London* 55: 444–468; translated in De Felipe J and Jones EG. 1988. *Cajal on the cerebral cortex. An annotated translation of the complete writings*, pp. 83–88. Oxford University Press, New York.
- Ramirez-Salcedo, J. (2014). Microarreglos de DNA: Fabricación Proceso y Análisis. En L. Chavez, J. L. Santillán-Torrez, & S. Guzmán-León (Eds.), *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* (pp. 203-229). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat), Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC) y Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I).
- Rapport, M. M., Green, A. A., & Page, I. H. (1948). Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *The Journal of biological chemistry*, 176(3), 1243–1251.
- Renner, U., Zeug, A., Woehler, A., Niebert, M., Dityatev, A., Dityateva, G., Ponimaskin, E. G. (2012). Heterodimerization of serotonin receptors 5-HT1A and 5-HT7 differentially regulates receptor signalling and trafficking. *Journal of Cell Science*, 125(Pt 10), 2486–2499. <https://doi.org/10.1242/jcs.101337>
- Riedel, G., Micheau, J., Lam, A. G., Roloff, E. L., Martin, S. J., Bridge, H., de Hoz, L., Poeschel, B., McCulloch, J., & Morris, R. G. (1999). Reversible neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes. *Nature neuroscience*, 2(10), 898–905. <https://doi.org/10.1038/13202>
- Rojas, P. S., Aguayo, F., Neira, D., Tejos, M., Aliaga, E., Muñoz, J. P., Fiedler, J. L. (2017). Dual effect of serotonin on the dendritic growth of cultured hippocampal

- neurons: Involvement of 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 85(May), 148–161. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2017.09.009>
- Roy, D. S., Kitamura, T., Okuyama, T., Ogawa, S. K., Sun, C., Obata, Y. Tonegawa, S. (2017). Distinct Neural Circuits for the Formation and Retrieval of Episodic Memories. *Cell*, 170(5), 1000-1012.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.013>
- Segovia, G., Yagüe, A. G., García-Verdugo, J. M., & Mora, F. (2006). Environmental enrichment promotes neurogenesis and changes the extracellular concentrations of glutamate and GABA in the hippocampus of aged rats. *Brain Research Bulletin*, 70(1), 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2005.11.005>
- Shapiro, M. (2001). Plasticity, hippocampal place cells, and cognitive maps. *Archives of Neurology*, 58(6), 874–881. <https://doi.org/10.1001/archneur.58.6.874>
- Sharp, T., & Barnes, N. M. (2020). Central 5-HT receptors and their function; present and future. *Neuropharmacology*, 177, 108155. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108155>
- Szapiro, G., Izquierdo, L. A., Alonso, M., Barros, D., Paratcha, G., Ardenghi, P., Pereira, P., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2000). Participation of hippocampal metabotropic glutamate receptors, protein kinase A and mitogen-activated protein kinases in memory retrieval. *Neuroscience*, 99(1), 1–5. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(00\)00236-0](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00236-0)
- Szapiro, G., Galante, J. M., Barros, D. M., Levi de Stein, M., Vianna, M. R., Izquierdo, L. A., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2002). Molecular mechanisms of memory retrieval. *Neurochemical research*, 27(11), 1491–1498. <https://doi.org/10.1023/a:1021648405461>
- Sherrington CS. 1897. The central nervous system. In *A textbook of physiology*, 7th ed. (ed. Foster M), Vol. 3. MacMillan, London.
- Schulz, B., Fendt, M., Gasparini, F., Lingenhöhl, K., Kuhn, R., & Koch, M. (2001). The metabotropic glutamate receptor antagonist 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP) blocks fear conditioning in rats. *Neuropharmacology*, 41(1), 1–7. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(01\)00036-3](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(01)00036-3)

- Soltész, I., & Losonczy, A. (2018). CA1 pyramidal cell diversity enabling parallel information processing in the hippocampus. *Nature Neuroscience*, 21, 484–493. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0118-0>
- Squire, L. R. (2004). Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory*, 82(3), 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2004.06.005>
- Steele, R. J., & Morris, R. G. (1999). Delay-dependent impairment of a matching-to-place task with chronic and intrahippocampal infusion of the NMDA-antagonist D-AP5. *Hippocampus*, 9(2), 118–136. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1999\)9:2<118::AID-HIPO4>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1999)9:2<118::AID-HIPO4>3.0.CO;2-8)
- Stiedl, O., Pappa, E., Konradsson-Geuken, Å., & Ågren, S. O. (2015). The role of the serotonin receptor subtypes 5-HT1A and 5-HT7 and its interaction in emotional learning and memory. *Frontiers in Pharmacology*, 6(August), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00162>
- Sudhakaran, I. P., & Ramaswami, M. (2017). Long-term memory consolidation: The role of RNA-binding proteins with prion-like domains. *RNA Biology*, 14(5), 568–586. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1244588>
- Szapiro, G., Galante, J. M., Barros, D. M., Levi de Stein, M., Vianna, M. R., Izquierdo, L. A., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2002). Molecular mechanisms of memory retrieval. *Neurochemical research*, 27(11), 1491–1498. <https://doi.org/10.1023/a:1021648405461>
- Tellez, R., Gómez-Viquez, L., Liy-Salmeron, G., & Meneses, A. (2012). GABA, glutamate, dopamine and serotonin transporters expression on forgetting. *Neurobiology of Learning and Memory*, 98(1), 66–77. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2012.05.001>
- Terranova, J. I., Ogawa, S. K., & Kitamura, T. (2019, October 17). Adult hippocampal neurogenesis for systems consolidation of memory. *Behavioural Brain Research*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112035>
- Tran, L. M., Josselyn, S. A., Richards, B. A., & Frankland, P. W. (2019). Forgetting at biologically realistic levels of neurogenesis in a large-scale hippocampal

- model. *Behavioural brain research*, 376, 112180.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112180>
- Tsien, J. Z. (2012). Eighth Edition Acknowledgments and History. *Basic Neurochemistry*, xxi. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374947-5.00067-5>
- Van Praag, H. M. (2004). The cognitive paradox in posttraumatic stress disorder: A hypothesis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 28(6), 923–935. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2004.05.011>
- van Praag, H., Kempermann, G., & Gage, F. H. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci*, 1(3), 191–198. <https://doi.org/10.1038/35044558>
- Vasefi, M. S., Yang, K., Li, J., Kruk, J. S., Heikkila, J. J., Jackson, M. F., MacDonald, J. F., & Beazely, M. A. (2013). Acute 5-HT7 receptor activation increases NMDA-evoked currents and differentially alters NMDA receptor subunit phosphorylation and trafficking in hippocampal neurons. *Molecular brain*, 6, 24. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-6-24>
- Vianna, M. R., Barros, D. M., Silva, T., Choi, H., Madche, C., Rodrigues, C., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2000). Pharmacological demonstration of the differential involvement of protein kinase C isoforms in short- and long-term memory formation and retrieval of one-trial avoidance in rats. *Psychopharmacology*, 150(1), 77–84. <https://doi.org/10.1007/s002130000396>
- Volpicelli, F., Speranza, L., di Porzio, U., Crispino, M., & Perrone-Capano, C. (2014). The serotonin receptor 7 and the structural plasticity of brain circuits. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8(September), 318. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00318>
- Wang, H., Hu, Y., & Tsien, J. Z. (2006). Molecular and systems mechanisms of memory consolidation and storage. *Progress in Neurobiology*, 79(3), 123–135. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.06.004>
- Witkin, J. M., Baez, M., Yu, J., Barton, M. E., & Shannon, H. E. (2007). Constitutive deletion of the serotonin-7 (5-HT7) receptor decreases electrical and chemical seizure thresholds. *Epilepsy Research*, 75(1), 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2007.03.017>

Yau, S. Y., Li, A., & So, K. F. (2015). Involvement of Adult Hippocampal Neurogenesis in Learning and Forgetting. *Neural Plasticity*, 2015(June). <https://doi.org/10.1155/2015/717958>

Anexo 1.

Artículo derivado de la tesis

Solís-Guillén, R., Leopoldo, M., Meneses, A., & Centurión, D. (2021). Activation of 5-HT1A and 5-HT7 receptors enhanced a positively reinforced long-term memory. *Behavioural brain research*, 397, 112932. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112932>



Contents lists available at ScienceDirect

Behavioural Brain Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbr

Research report

Activation of 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors enhanced a positively reinforced long-term memory

Rocío Solís-Guillén^a, Marcello Leopoldo^b, Alfredo Meneses^{a,1}, David Centurión^{a,*,2}^a Departamento de Farmacobiología, Cinvestav Unidad Coapa, Cxda. de los Tenorios 235, Col. Granjas-Coapa, Del. Tlalpan, C.P. 14330, México D.F., México^b Dipartimento di Farmacia - Scienze del Farmaco, Università degli Studi di Bari "A Moro", Bari, Italy

ARTICLE INFO

Keywords:

Memory
5-HT
Autoshaping
8-OH-DPAT
LP 211

ABSTRACT

Memory is one of the most important capabilities of our mind since it determines our individuality. Memory formation involves different stages: acquisition, consolidation and retrieval. There are many studies about early stages, however little is known about memory retrieval. Retrieval is the use of learned information and represents a big problem in patients with memory deficits where the main issue is that they can learn but cannot remember. Previous findings have demonstrated that 5-hydroxytryptamine (5-HT) is a neurotransmitter involved in memory process. Hence, here we are exploring the role of 5-HT in memory retrieval by using its metabolic precursor L-tryptophan and several ligands at 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors. Experimental protocol consisted of evaluating conditioned responses (%CR) after one week of interruption following autoshaping sessions for memory formation; a decrease of %CR was interpreted as memory decay. Systemic administration of: (1) L-tryptophan (50 and 100 mg/kg), (2) 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT (0.031 and 0.062 mg/kg), (3) the selective antagonist 5-HT_{1A} receptor WAY 100635 (0.3 and 0.6 mg/kg), (4) the 5-HT₇ receptor agonist, LP 211, in a dose-dependent manner (1, 2.5, 5.0 and 10.0 mg/kg) enhanced memory retrieval. Further, the 5-HT₇ receptor antagonist, SB 269970 (10.0 mg/kg), had no effect. Finally, SB 269970 (10.0 mg/kg) significantly blocked memory retrieval enhancement produced by 10.0 mg/kg LP 211, but not that induced by 2.5 mg/kg LP 211. These results, taken together, suggest that activation of 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors enhanced memory retrieval and these receptors may be therapeutic targets to improve long-term memory retrieval.

1. Introduction

Memory is the capability that allow us to link experiences, learn and make sense of our lives [1]. It is the result of various dynamic and interactive processes that include encoding or acquiring new information, short-term memory, consolidation and maintenance of long-term memory, and memory retrieval [2,3]. Particularly, memory consolidation is a time-dependent process which involves cellular mechanisms such as protein synthesis; finally, memory is encoded and stored [4]. During the consolidation of memory, there are several conditions that provide an opportunity to regulate the strength of memory [5], and this strength could results in a memory retrieval. Internal or external sensory signal and memory traces drive memory retrieval [6], which is the only possible measure of memory [7].

Understanding the physiological mechanisms of memory retrieval

using pharmacological tools could provide information of possible therapeutic targets that allow the development of some strategies that might be used: (1) in a memory loss associate to age or, (2) diseases associated to lost memory (e.g. Alzheimer).

Serotonin (5-hydroxytryptamine; 5-HT) is a major neurotransmitter implicated in the regulation of many mechanisms in the central nervous system (CNS), including mood, anxiety, aggression, learning and memory processes [8]. In this sense, acute tryptophan depletion, a metabolic precursor of 5-HT, decreased 5-HT plasma levels and impaired memory [9,10], while chronic systemic administration of tryptophan, at 50 and 100 mg/kg: (1) improved memory in radial arm maze and passive avoidance, and (2) increased plasma and cerebral levels of 5-HT and its main metabolite, 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) [11].

5-HT acts through at least 14 receptors grouped in 7 families [12].

* Corresponding author.

E-mail address: dcenuri@cinvestav.mx (D. Centurión).¹ Rest in peace.² Web page: <https://www.farmacobiologia.cinvestav.mx/Personal-Académico/Dr-D-Centurión-Pacheco>.

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112932>

Received 3 June 2020; Received in revised form 27 August 2020; Accepted 22 September 2020

Available online 25 September 2020

0166-4328/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

The fact that 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors are co-expressed in many brain regions (i.e. hippocampus), may imply that both receptors are involved in the same brain function, for example, hypothermia [13].

In this respect, it has been suggested that regulation of 5-HT_{1A} receptor expression could be beneficial and could be pharmacologically manipulated [14]. Immunohistochemical studies have reported a decrease in 5-HT_{1A} receptor in the hippocampus [15] and raphe nuclei [16] in postmortem tissues from patients with Alzheimer Disease. Consistent with the above, in transgenic mice that develop β -amyloid (A β) plaques (Tg2576) or both A β plaques and neurofibrillary tangles (3xTg), a reduction of binding sites for 5-HT_{1A} receptors in hippocampus and cortex has been observed [17].

Furthermore, in an experimental model of AD with i.c.v. injection of streptozotocin, it has been reported that AS19 (1 μ g/ μ l, i.c.v. daily for 30 days), a 5-HT₇ receptor agonist, reestablished hippocampal LTP and reduced neuronal apoptosis in the dentate granule cells [18]. Thus, 5-HT₇ receptor activation by AS19 restored synaptic function through the reduction of apoptosis in the hippocampus; this mechanism may delay the progression of Alzheimer Disease [18].

On the other hand, several studies have shown the potential role of 5-HT₇ receptors in amnesia. In this respect, in an autoshaping Pavlovian/instrumental learning task, LP 211, a 5-HT₇ receptor agonist, reversed scopolamine-induced amnesia; meanwhile AS19, another 5-HT₇ receptor agonist: (1) increased memory consolidation, sensitive to SB 269970, a 5-HT₇ receptor antagonist, and (2) attenuated mRNA 5-HT₇ receptor expression [19]. Further, LP 211: (1) failed to affect short-term memory (STM), and (2) improved long-term memory (LTM), which was antagonized by SB 269970 [19]. Thus, as previously suggested [20], the promnesic and/or anti-amnesic effects of drugs acting at 5-HT₇ receptors strongly depend on the basal level of performance [20].

Although the role of 5-HT₇ receptors in LTM has been established, the role of 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors in memory retrieval has not been explored. Hence, in this study, we explore the role of 5-HT in memory retrieval with special emphasis in analyzing the involvement of 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors using an autoshaping learning task. Firstly, memory course was determined. Next, the effect of L-tryptophan was analyzed in order to evaluate the effect of the increase the endogenous levels of 5-HT on memory retrieval. Finally, the effect of agonists and antagonists at 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors were determined. To the best of our knowledge, these pharmacological manipulations remain unexplored in memory retrieval protocols. Therefore, we are addressing the hypothesis that 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors might modulate memory retrieval.

2. Material and methods

2.1. Animals

Animals were obtained from animal facility at the Pharmacobiology Department, Cinvestav. Adult male Wistar rats (weighing 250–300 g) of 12 weeks-old were used. Animals were housed at temperature (22 \pm 1 $^{\circ}$ C), light-controlled room under a 12:12 h light-dark cycle (cycle started at 7:00 a.m.), and food and water were available *ad libitum*. After one week of habituation to the environment, body weights were reduced to 85 % by gradually limiting the food intake for seven days. Rats had free access to food for 30 min before each experiment. All experimental procedures were approved by the Institutional Review Committee (CICUAL; Project No. 047/02) for the use of animal subjects, and followed the regulations established by the Mexican Official Norm for the Use and Welfare of Laboratory Animals (NOM-062-ZOO-1999) in compliance with the National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals [21]. It should be emphasized that each animal was assigned only to a specific group.

2.2. Autoshaping learning task

2.2.1. Apparatus

The autoshaping learning task apparatus (Coulbourn Instruments, Lehigh Valley, PA, USA) comprised a standard sound-attenuation system. The dimensions were 25 cm width, 29 cm in length and 25 cm in height with a floor of bars. A standard illuminable nose-poke operandum placed 4 cm above the floor and 10 cm from the right and left walls was used as a conditioned stimulus (CS). For unconditioned stimulus (US), a food-pellet was used and delivered into a food magazine, positioned 5 cm to the right of the lever and 3 cm above the ground. A house light was located in the right top corner and kept turned on during the session period.

2.2.2. Habituation

Habituation consisted in the following procedure: each animal was placed in an experimental chamber and had free access to 50 food-pellets (45 mg each), previously placed into the food-magazine. Autoshaping program started once the animal ate all food-pellets and presented 150 nose-pokes (measured by a photocell) into the food-magazine.

2.2.3. Autoshaping

Autoshaping training consisted of discrete trials. A trial was composed of conditioned stimulus-unconditioned stimulus (CS-US) presentations and involved the illumination of the CS nose-poke during 8 s followed by the delivery into the food-magazine of the US (Pavlovian sequential pairing stimulus-stimulus [S-S]) followed by the inter-trial interval (ITI) of 60 s. When the animal inserted its nose into the CS, the light was turned off and a food pellet (US) was immediately delivered (instrumental sequential pairing response-stimulus [R-S]), then the ITI was initiated. Response during CS is a conditioned response (CR), increase or decrease of CR was considered as an enhancement or impairment of memory (index of memory), respectively. The autoshaping training session consisted of 10 trials and the autoshaping testing sessions consisted of 20 trials. Autoshaping program reports every nose-poke as a percent of total trials and these data are considered raw data. Animals were tested at 1.5, 24, 48 and finally at 216 h. The time between 48 and 216 h was called "interruption period", since there was not autoshaping sessions.

The interruption period was based on a preliminary report [22]. The authors described that rats had a decreased number of CR% after seven days of interruption following autoshaping training/testing sessions; this decreased retention was called memory decay [22].

In our experimental procedure; the particular level of %CR at 48 h was considered the baseline of retention for each rat, also called "maximum retention". Data were expressed as the percentage of this retention per animal and represented the measurement of memory. Diminished number of CRs was interpreted as memory decay while unchanged or increased CR as enhancement memory retrieval.

No significant performance differences at baseline occurred among animals. Only animals presenting progressive performance and presenting CR in two consecutive sessions were included. Certainly, although no standard error mean (SEM) of maximum retention is showed in the figures (Figs. 3 to 5, left bar) the raw data of each rat was subjected to the statistical analysis and then normalized. To avoid any other interference on memory formation, the animals did not receive any further manipulation. Around 70–80 % of animals tested met the criteria of progressive performance. Behavioral parameters were reported and a decreased number of CRs was considered memory decay, while unchanged or increased CR suggested an enhancement or reinforcement of memory retrieval.

2.3. Drug treatments

Drugs were administered systemically immediately following the

fourth autoshaping session (see Fig. 1A). Finally, the interruption period (i.e., no autoshaping sessions lasting 168-h) occurred. The following drugs were tested: L-tryptophan, 8-OH-DPAT (5-HT_{1A} agonist), WAY 100635 (5-HT_{1A} antagonist), LP 211 (5-HT₇ receptor agonist) and SB 269970 (5-HT₇ receptor antagonist).

2.3.1. 5-HT_{1A} receptor

Following the 48 h session, the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT (0.031 or 0.062 mg/kg) or the selective 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY 100635 (0.3 or 0.6 mg/kg) were intraperitoneally (i.p.) injected. Finally, two subgroups received either: (1) WAY 100635 (0.3 mg/kg) and 5 min later 8-OH-DPAT (0.031 mg/kg); or (2) WAY 100635 (0.6 mg/kg) and 5 min later 8-OH-DPAT (0.062 mg/kg).

2.3.2. 5-HT₇ receptor

After the 48 h session, the 5-HT₇ receptor agonist LP 211 (0.5, 1.0, 2.5, 5.0 or 10.0 mg/kg) or the 5-HT₇ antagonist SB 269970 (10.0 mg/kg) were subcutaneously (s.c.) or intraperitoneally administered, respectively. Lastly, two subgroups received the co-administration of: (1) SB 269970 (10.0 mg/kg) + LP 211 (2.5 mg/kg); or (2) SB 269970 (10.0 mg/kg) + LP 211 (10.0 mg/kg). The second drug was administered after 5 min of the first administration and all groups were tested after the interruption period.

2.4. Drugs

Doses were based on previous works. The 5-HT_{1A} agonist, 8-hydroxy-2-(di-*n*-propylamino)-tetralin (8-OH-DPAT) [23,24]; the selective 5-HT_{1A} receptor antagonist *N*-[2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-*N*-(2-pyridinyl)cyclohexanecarboxamide trihydrochloride (WAY 100635) [23,25]. The 5-HT₇ receptor agonist *N*-(4-cyanophenylmethyl)-4-(2-biphenyl)-1-piperazinehexanamide (LP 211) was donated by Prof. Marcelo Leopoldo (Bari, Italy) [26]; 5-HT₇ antagonist: (R)-3-(2-(2-(4-methylpiperidin-1-yl)ethyl)pyrrolidine-1-sulfonyl)phenol (SB 269970) [24,27,28]. Except for LP 211, all other compounds used were purchased from Tocris Bioscience Ltd. (Ellisville, MO,

USA) or otherwise is indicated in parentheses. All compounds were prepared fresh. L-tryptophan was prepared in warm water [11,29] and LP 211 was prepared in ethanol at 10% [30]. All other compounds were prepared in saline. The control vehicle groups received either saline or ethanol at 10%. Animals received a single administration (1 mL/kg) after the fourth autoshaping session. Table 1 shows the different affinities of drugs for 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors.

2.5. Statistical analysis and figures

For the memory formation (saline control group), the data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test. Student's *t*-test was applied when control data were normalized as percent of conditioned response. For administered groups, two comparisons were performed: 1) each group itself was compared at 48 versus 216 h; and 2) each group administered with the control group (at 216 h). Two-way ANOVA repeated measures followed by Tukey or Dunnett's post-hoc test was also used. The results were computed by SigmaPlot v12.0 (Systat Software, San Jose, CA, USA). For statistical comparisons, *p* < 0.05 was used as the criterion for significance. The sample size was 6–13 animals, and independent groups were used for each experiment (Fig. 1B).

Table 1
Binding affinities of 5-HT compounds to 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors.

Drug	pKi		References
	5-HT _{1A}	5-HT ₇	
8-OH-DPAT	8.2	7.5	[46]
WAY 100635	7.2–7.7	–	[46]
SB 269970	<5	8.9	[47]
LP 211	6.7 (rat)	9.2 (rat)	[30]
	6.4 (human)	7.8 (human)	

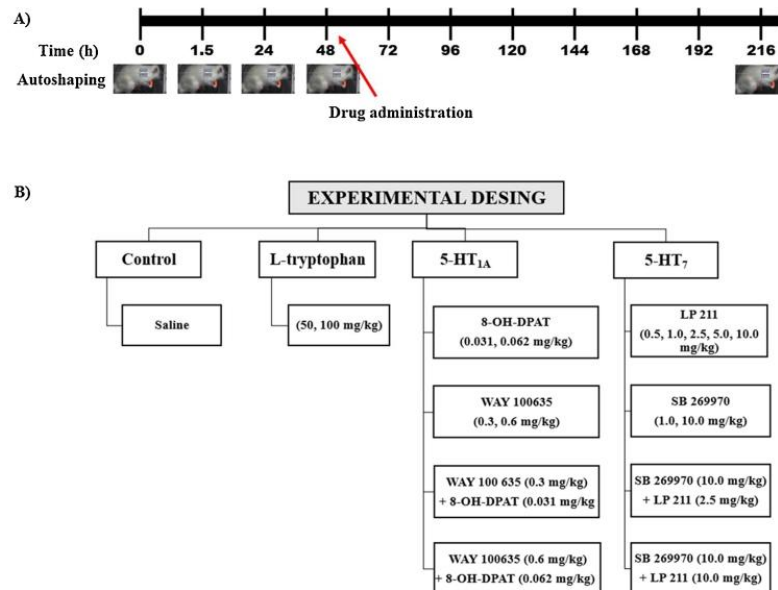


Fig. 1. Experimental protocol. A. Temporal course of autoshaping and drug administration. B. Experimental design. Animals received only one dose after the 48 h autoshaping session.

3. Results

3.1. Memory formation and memory retrieval

Fig. 2A shows time-course of memory formation at 0–48 h. Mean ± s.e.m. of learning/training at 0, 1.5, 24 and 48 h were, respectively: 9 ± 5 %, 15 ± 3 %, 23 ± 3 %, 39 ± 5 %. Interestingly, a significant decrease of memory was revealed at 216 h (16 ± 4 %), when compared to 48 h [$F_{(4,60)} = 6.82$; $p < 0.001$]. The post-hoc analysis (Tukey) showed significant increases ($p < 0.05$) in %CR between 1.5 h vs. 48 h groups, meanwhile an important decrease at 216 h was observed. In line with a previous report [22], the temporal course of conditioned responses (CR) in memory formation and memory retrieval is also shown in raw data (Fig. 2A) and normalized data (Fig. 2B). Table 2 shows the raw data of the maximum retention in each group of animals included in this study, at 48 and 216 h. Using these data, we calculated the proportion in percentage of CR shown at 216, as previously reported [22]. Since the levels of maximum retention vary among animals, as shown in Table 2, the maximum retention per subject, at 48 h, was normalized as percent of memory retrieval, i.e., 100 %. This normalization was performed in Fig. 2B and the following figures. Keeping in mind this analysis, after 216 h, we observed a statistically significant reduction (t, test; $p < 0.05$) to 39.8 ± 8.1 from maximum retention (100 %).

3.2. Effect of L-tryptophan on memory retrieval

Fig. 3 shows the effect of L-tryptophan (50 or 100 mg/kg) in memory. Interestingly, L-tryptophan, at the dose of 100 mg/kg, displayed significant effects (103 ± 29 %CR) (Dunnett's Method, $p < 0.05$) when compared to saline control group (40 ± 12 %CR) following the interruption period (Fig. 3). Meanwhile, 50 mg/kg L-tryptophan only produced a slight, non-significant, enhancement memory retrieval (78 ± 23

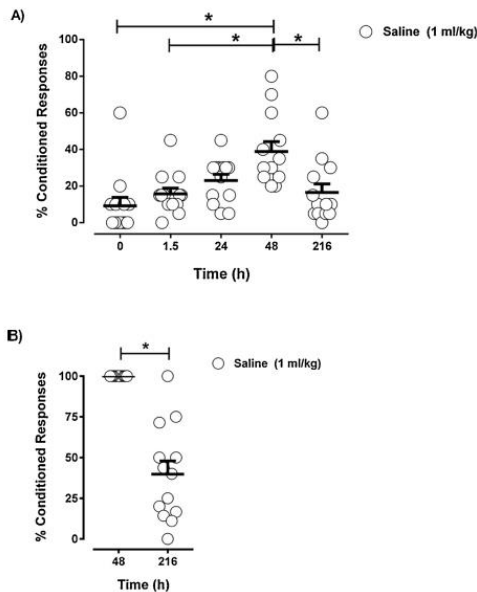


Fig. 2. Memory formation and memory retrieval. A) Raw data of temporal course of memory formation until 48 h (maximum retention) and decreased memory retention at 216 h. B) Normalized data as a percentage of maximum retention and memory recovery after seven days without autoshaping sessions. Each bar represents mean ± S.E.M. of 13 animals. Data were analyzed by Student's t-test. * $p < 0.05$.

Table 2

Raw data (% CR) before normalization.

Figure	Treatment (mg/kg)	Time (h)	
		48	216
Fig. 2	Saline (1 ^o)	39 ± 5	17 ± 5
	Saline (1 ^o)	44 ± 8	19 ± 7
Fig. 3	L-Tryptophan (50)	26 ± 5	17 ± 4
	L-Tryptophan (100)	27 ± 4	28 ± 8
	Saline (1 ^o)	44 ± 8	19 ± 7
Fig. 4	8-OH-DPAT (0.031)	39 ± 5	28 ± 6
	8-OH-DPAT (0.062)	37 ± 6	35 ± 4
	WAY 100635 (0.3)	49 ± 4	38 ± 9
	WAY 100635 (0.6)	30 ± 8	47 ± 7
	8-OH-DPAT (0.031) + WAY 100635 (0.3)	30 ± 5	7 ± 4
	8-OH-DPAT (0.062) + WAY 100635 (0.6)	52 ± 11	24 ± 11
	Ethanol 10 % (1 ^o)	39 ± 8	10 ± 5
Fig. 5	LP 211 (0.5)	30 ± 5	3 ± 2
	LP 211 (1.0)	46 ± 8	18 ± 5
	LP 211 (2.5)	48 ± 7	28 ± 9
	LP 211 (5.0)	44 ± 9	35 ± 14
	LP 211 (10.0)	49 ± 6	48 ± 6
	Saline (1 ^o)	43 ± 7	18 ± 6
	SB 269970 (10)	51 ± 8	18 ± 4
	SB 269970 (10) + LP 211 (2.5)	42 ± 6	49 ± 9.0
SB 269970 (10) + LP 211 (10)	41 ± 9	32 ± 13	

Note: Each value represents mean ± S.E.M. +, ml/kg.

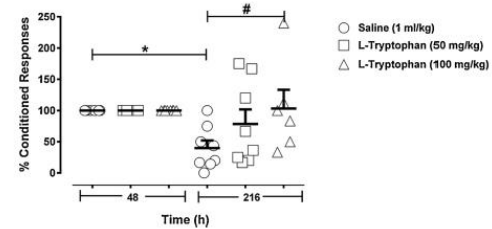


Fig. 3. Effect of L-Tryptophan (50 or 100 mg/kg) on memory retrieval. All rats received injection immediately after the maximum retention (48 h), and they were tested at 216 h. Each bar represents mean ± S.E.M. of 6-8 animals. Data were analyzed by two-way ANOVA and post-hoc Dunnett's test. * $p < 0.05$ when compared the group of saline at 48 and 216 h. # $p < 0.05$ when compared saline group versus L-Tryptophan at 216 h. For better visualization, subsequent graphs will keep just one left bar to illustrate the maximum retention in all groups at 48 h.

%CR). Further, Two-way ANOVA revealed significant differences only among times [$F_{(1,38)} = 4.27$, $p = 0.046$].

At this point, it is convenient to emphasize that, for the sake of clarity, in this graph, all left bars represent a maximum retention of each group evaluated. Thus, for better visualization, the subsequent graphs will keep one bar to indicate the maximum retention of all groups.

3.3. Effect of the 5-HT_{1A} receptor agonist (8-OH-DPAT) and antagonist (WAY 100635) on memory retrieval

Fig. 4A shows the effect of 8-OH-DPAT (0.031 or 0.062 mg/kg), a 5-HT_{1A} receptor agonist, at 48 and 216 h. Notably, 8-OH-DPAT, significantly and dose-dependently increased the %CR when compared to saline control group. In this respect, two-way ANOVA showed significant differences respect to treatments [$F_{(2,42)} = 4.0$, $p = 0.028$], times [$F_{(1,42)} = 8.2$, $p < 0.006$] and the interaction of these variables [$F_{(2,42)} = 4$, $p = 0.028$]. Post-hoc Dunnett's method showed that the %CR of 8-OH-DPAT (0.031 mg/kg) was statically different ($p < 0.05$) vs control meanwhile the dose of 0.062 mg/kg group was highly significant ($p < 0.05$) when compared with the control group (Fig. 4A).

Fig. 4B shows the effect of the selective 5-HT_{1A} receptor antagonist,

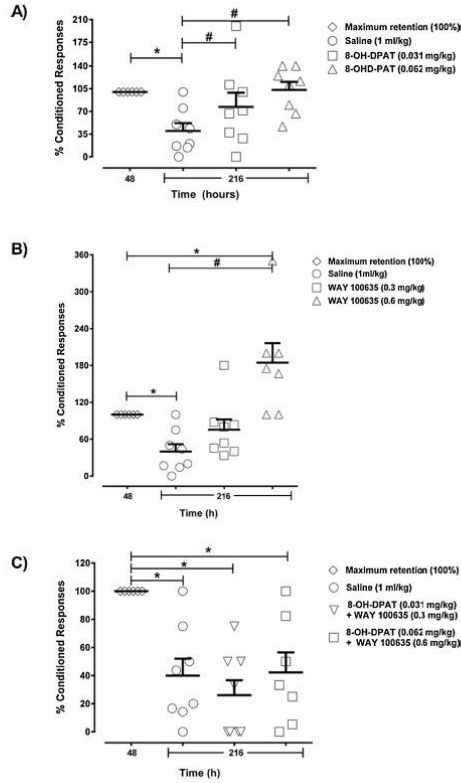


Fig. 4. Effect of: (A) 8-OH-DPAT (0.031 and 0.062 mg/kg), (B) WAY-100635 (0.3 and 0.6 mg/kg) and (C) the combination of WAY 100635 + 8-OH-DPAT on memory retrieval. All rats received injection immediately after the maximum retention (48 h), and they were tested at 216 h. Each bar represents mean \pm S.E.M. of 7-8 animals. Data were analyzed by two-way ANOVA and post-hoc Dunnett's test. * $p < 0.05$, when compared vs maximum retention. # $p < 0.05$, vs saline at 216 h. Saline group is the same in all graphs.

WAY 100635 (0.3 or 0.6 mg/kg). Interestingly, WAY 100635 dose-dependently increased the %CR when compared to the saline control group. Two-way ANOVA showed significant differences respect to treatments [$F_{(2,40)} = 12.5, p < 0.001$], times [$F_{(1,40)} = 0.00000485, p < 0.001$] and the respective interaction of these variables [$F_{(2,40)} = 12.5, p < 0.001$]. It should be emphasized that the dose of 0.6 mg/kg WAY 100635 significantly increased the percent of CR to 180 %.

In order to determine a possible pharmacological interaction between both drugs, we combined the lower and higher doses of each one. Thus, Fig. 4C shows the effect of the co-administration of 0.031 mg/kg 8-OH-DPAT + 0.3 mg/kg WAY 100635 or the co-administration of 0.062 mg/kg 8-OH-DPAT + 0.6 mg/kg WAY 100635. Unexpectedly, both co-administrations failed to significantly increase percent CR compared to the saline control group at 216 h. Two-way ANOVA did not show significant differences with respect to treatments [$F_{(2,40)} = 0.52, p = 0.599$], although showed significant differences with respect to time [$F_{(1,40)} = 81.395, p < 0.001$]; further, the interaction of variables did not show statistically differences [$F_{(2,40)} = 0.52, p = 0.599$].

3.4. Effect of the 5-HT₇ receptor agonist (LP 211) and antagonist (SB 269970) on memory

Fig. 5A shows LP 211 effect on memory consolidation. LP 211 was tested and revealed that: (1) did not significantly modify memory consolidation, at the dose of 0.5 mg/kg when compared versus its respective vehicle (ethanol 10 %); and (2) enhanced memory retrieval in dose-dependent manner (1.0, 2.5, 5.0 or 10.0 mg/kg). Two-way ANOVA showed significant differences respect to treatments [$F_{(5,60)} = 2.8, p < 0.022$], times [$F_{(1,60)} = 16.7, p < 0.001$] and the interaction between these variables [$F_{(5,60)} = 2.8, p < 0.022$]. The dose of 0.5 mg/kg LP 211 significantly diminished %CR (Dunnett's Method, $p < 0.05$), although it was not significantly different to ethanol 10 % control group. In addition, 5-HT₇ receptor agonist, LP 211, at doses of 5 and 10.0 mg/kg, enhanced memory retrieval [Dunnett's Method, $p < 0.05$].

In marked contrast, Fig. 5B shows that the 5-HT₇ receptor antagonists SB 269970 (10.0 mg/kg), given alone, failed to affect memory consolidation when compared with its respective vehicle (saline). Two-way ANOVA only showed significant [$F_{(1,36)} = 0.0086, p < 0.001$] differences respect to time (48 versus 216 h).

Finally, Fig. 5C shows that the co-administrations of SB 269970 10.0 mg/kg + LP 211 2.5 mg/kg, improved memory retrieval since it produced increases of maximum retention from 100 % to 134 ± 37 % at 216 h. Thus, this latter group displayed significant increments of %CR (Tukey test, $p < 0.05$) vs saline control group. Two-way ANOVA of 5-HT₇ receptor antagonist and agonist co-administration showed significant differences with respect to treatments [$F_{(5,50)} = 3.6, p < 0.019$],

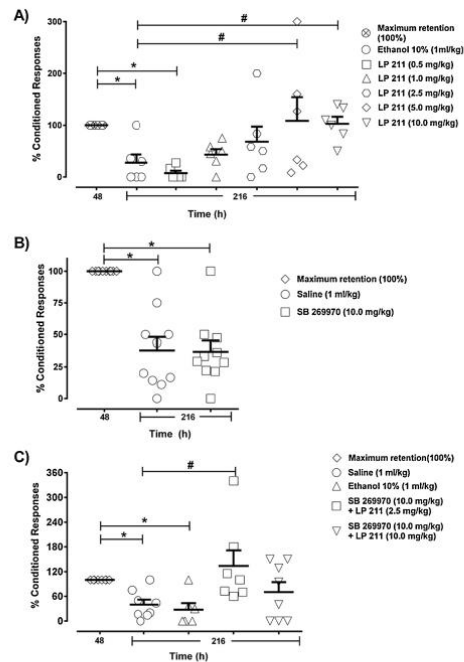


Fig. 5. Effect of: (A) LP 211 (0.5, 1, 2.5, 5 and 10 mg/kg), (B) SB 269970 (10 mg/kg) and (C) the combination of SB 269970 + LP 211 on memory retrieval. All animals were injected after the maximum retention (48 h) and were tested at 216 h. Each bar represents mean \pm S.E.M. of 6-10 animals. Data were analyzed by two-way ANOVA and post-hoc Dunnett's test. * $p < 0.05$, when compared vs maximum retention. # $p < 0.05$ vs vehicle (saline or ethanol 10 %) at 216 h.

times [$F_{(1,50)} = 6.8, p = 0.012$] and their interactions [$F_{(3,50)} = 3.6, p < 0.019$]. Importantly, 10 mg/kg SB 269970 significantly blocked the enhanced memory retrieval of 10 mg/kg LP 211, when both drugs were co-administrated.

4. Discussion

4.1. Memory formation and memory retrieval course

In this work, we observed several important effects: 1) progressive memory formation; 2) memory decay after seven days (168 h, which is the time between the maximum retention at 48 h and the last test at 216 h); this effect was called "memory decay"; 3) metabolic precursor L-tryptophan (100 mg/kg) reversed this effect; and 4) 8-OH-DPAT and LP 211 also reversed this effect, as well as WAY 100635. The first two effects were time-dependent, but memory retrieval is more complex and depends on more variables, such as the individual amount of retention and consolidation efficiency. One of the major and basic characteristics of autoshaping procedures includes that the animal learns conditioned response (CR) by itself without previous training; another critical aspect is that most animals learn to the CS before approaching the food magazine on at least some trials, and that some acquire a tendency to do this on almost all trials [31–33]. In the typical, classic or Pavlovian autoshaping procedures, the responses of the animal do not influence the reinforcer (i.e., food) delivery schedule [34]. Using this model, we explored the pharmacological bases of memory retrieval with particular emphasis in studying the involvement of 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors.

4.2. Memory retrieval and L-tryptophan

Administration of L-tryptophan slightly (50 mg/kg) or significantly (100 mg/kg) augmented %CR respect to the saline control group producing an enhancement of memory retrieval. It has been reported that acute L-tryptophan administration increased extracellular levels of 5-HT, returning to baseline levels after 160 min [35,36]. As memory decay is a time-dependent process, probably low levels of L-tryptophan were accompanied with memory extinction since acute L-tryptophan depletion impaired memory (e.g., an object recognition test) [37,38]. These results suggest that the effect of L-tryptophan on memory retrieval is related to the increased levels of 5-HT in the whole brain. Admittedly, more 5-HT quantification studies, which fall beyond the scope of the present investigation, would be needed to confirm these results. Next, we studied 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors for which 5-HT displays the highest affinity (Table 1).

4.3. Memory retrieval and 5-HT_{1A} receptor

The 5-HT_{1A} receptor agonist, 8-OH-DPAT (0.031 and 0.062 mg/kg), significantly enhanced memory retrieval. Similarly, the selective 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY 100635 (0.3 or 0.6 mg/kg) also elicited an increase in memory retrieval. These results clearly demonstrate the potential participation of 5-HT_{1A} receptors during memory retrieval. The effect of WAY 100635 on memory retrieval could suggest that the 5-HT_{1A} auto-receptors may be blocked and, thus, an increase of 5-HT may be occurred. Consistent with the above, we observed that L-tryptophan produced a similar effect. Certainly, 8-OH-DPAT display moderate affinity at 5-HT₇ receptors (see Table 1) and therefore, we cannot categorically exclude the activation of these receptors by this agonist. In addition, the enhancement of memory retrieval by 8-OH-DPAT was eliminated by the co-administration of 8-OH-DPAT (0.031 or 0.062 mg/kg) + WAY 100635 (0.3 or 0.6 mg/kg). Although we have no clear-cut explanation of these findings, we could suggest that 8-OH-DPAT may have activated 5-HT₇ receptors which, in turn, may have internalized 5-HT_{1A} auto-receptors, as previously demonstrated [39].

4.4. Memory retrieval and 5-HT₇ receptor

The 5-HT₇ receptor agonist LP 211 (0.5–10.0 mg/kg) produced a dual effect: (1) leading memory decay at the lowest dose tested (0.5 mg/kg), although this was not significant; and (2) reversed memory decay in a dose-dependent manner (1.0–10.0 mg/kg). The simplest interpretation of these findings is that activation of 5-HT₇ receptor enhanced memory retrieval by LP 211. On the other hand, the 5-HT₇ receptor antagonist, SB 269970, did not modify memory extinction. However, 5-HT₇ receptor participation was evidenced when SB 269970 (10 mg/kg) reversed the effect of LP 211 (2.5 or 10.0 mg/kg) on memory retrieval. Certainly, 5-HT₇ receptor-deficient mice showed lower scores in behavioral memory tasks such as fear conditioning and punishment memory; however, according to the authors, there was no consistency either the direction of behavioral effects across genotypes or assays [40]. Furthermore, it has been reported that SB 269970 (3.0 and 10.0 mg/kg, s.c.), with a 2-h or 4-h delay, impaired the discrimination of the novel object (i.e., reduced memory retrieval) [28]. Interestingly, mice treated with the 5-HT_{1/7} receptor agonist, 5-carboxamidotryptamine (1.0 mg/kg), showed significant discrimination (memory retrieval), which was blocked by SB 269970 (10 mg/kg). The authors concluded that activation 5-HT₇ receptor modulates cognitive processes implicated in object recognition [28].

4.5. Possible mechanism of action

5-HT could act as a neuromodulator in hippocampal neurons. For example, activation of 5-HT_{1A} autoreceptors coupled to Gi/o reduces 5-HT levels in the synaptic cleft. Further, 5-HT_{1A} inhibited LTP induction because reduced calcium currents and enhanced potassium currents. However, the effect of 8-OH-DPAT, a 5-HT_{1A} agonist, depends on the doses administered. At low doses, 8-OH-DPAT has precognitive effect meanwhile high doses has deleterious effect on memory formation. This biphasic effect could be due to activation of presynaptic (low doses) and postsynaptic (high doses) 5-HT_{1A} receptors, as previously observed in passive avoidance retention [41]. On the other hand, activation of 5-HT₇ receptors could activate several intracellular signaling pathways that activates gene transcription, neurite outgrowth and synaptogenesis, such as: (1) Gs-protein that could activate the cAMP-PAK-Ras-AKT/ERK; or (2) Gq₁₂-protein that results in the stimulation of Rho-dependent activation of transcription factors [42]. This, in turn, could potentiate formation of dendritic spines, increase neuronal excitability and plasticity [43]. In this context activation of 5-HT₇ receptors: (1) promotes NMDA receptor activity [44]; and (2) increases phosphorylation of A1 subunit AMPA receptor [45]; these events enhance long-term potentiation (LTP).

5. Conclusion

The present pharmacological study shows that memory retrieval seems to be a process requiring the activation of 5-HT_{1A} receptors and 5-HT₇ receptors. To the best of our knowledge, this is the first study showing the potential participation of 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors in the process of memory retrieval.

CRedit authorship contribution statement

Rocío Solís-Guillén: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Visualization, Writing - original draft. **Marcello Leopoldo:** Resources, Writing - review & editing. **Alfredo Meneses:** Conceptualization, Investigation, Methodology, Resources, Supervision, Visualization, Writing - review & editing. **David Centurión:** Investigation, Supervision, Visualization, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgments

Special thanks for the technical assistance to Jose Rodolfo Fernández. RSG was scholarship recipient from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (Ref. no. 277701).

References

- E. Camina, F. Güell, The neuroanatomical, neurophysiological and psychological basis of memory: current models and their origins, *Front. Pharmacol.* 8 (2017) 1–16, <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00438>.
- I. Izquierdo, J.H. Medina, M.R.M. Vianna, L.A. Izquierdo, D.M. Barros, Separate mechanisms for short- and long-term memory, *Behav. Brain Res.* 103 (1999) 1–11, [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(99\)00036-4](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(99)00036-4).
- E.R. Kandel, Y. Dudai, M.R. Mayford, The molecular and systems biology of memory, *Cell* 157 (2014) 163–186, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.001>.
- S.D. Schmidt, C.R.G. Furini, C.G. Zinn, L.E. Cavalcante, F.F. Ferreira, J.A. K. Behling, J.C. Myskiw, I. Izquierdo, Modulation of the consolidation and reconsolidation of fear memory by three different serotonin receptors in hippocampus, *Neurobiol. Learn. Mem.* 142 (2017) 48–54, <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.12.017>.
- J.L. McGaugh, Making lasting memories: remembering the significant, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 10402–10407, <https://doi.org/10.1073/pnas.1301209110>.
- P.W. Frankland, S.A. Josselyn, S. Köhler, The neurobiological foundation of memory retrieval, *Nat. Neurosci.* 22 (2019) 1576–1585, <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0493-1>.
- G. Szapiro, J.M. Galante, D.M. Barros, M. Levi de Stein, M.R.M. Vianna, L. A. Izquierdo, I. Izquierdo, J.H. Medina, Molecular mechanisms of memory retrieval, *Neurochem. Res.* 27 (2002) 1491–1498, <https://doi.org/10.1023/A:1021648405461>.
- A. Gasbarri, A. Pompili, Serotonergic 5-HT7 receptors and cognition, *Rev. Neurosci.* 25 (2014) 311–323, <https://doi.org/10.1515/revneuro-2013-0066>.
- P. Cowen, A.C. Sherwood, The role of serotonin in cognitive function: evidence from recent studies and implications for understanding depression, *J. Psychopharmacol.* 27 (2013) 575–583, <https://doi.org/10.1177/026981113482531>.
- B.Y. Silber, J.A.J. Schmitt, Effects of tryptophan loading on human cognition, mood, and sleep, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 34 (2010) 387–407, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2009.08.005>.
- S. Khalig, S. Haider, S.P. Ahmed, T. Perveen, D.J. Haleem, Relationship of brain tryptophan and serotonin in improving cognitive performance in rats, *Pak. J. Pharm. Sci.* 19 (2006) 11–15.
- R. Andrade, N.M. Barnes, G. Baxter, J. Bockaert, T. Branchek, A. Butler, M. L. Cohen, A. Dumuis, R.M. Eglen, M. Göthert, M. Hamblin, M. Hamon, P.R. Hartig, R. Hen, J. Hensler, K. Herrick-Davis, R. Hills, D. Hoyer, P.P.A. Humphrey, K. P. Latté, L. Maroteaux, G.R. Martin, D.N. Middlemiss, E. Mylecharane, J. Neumaier, S.J. Peroutka, J.A. Peters, B. Roth, P.R. Saxena, T. Sharp, A. Sleight, C.M. Villalon, F. Yocca, 5-Hydroxytryptamine receptors (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database, IUPHAR/BPS Guid. Pharmacol. CITE 2019 (2019), <https://doi.org/10.2218/gtopdb/f1/2019.4>.
- V.S. Naumenko, N.K. Popova, E. Lacivita, M. Leopoldo, E.G. Ponimaskin, Interplay between serotonin 5-HT1A and 5-HT7 receptors in depressive disorders, *CNS Neurosci. Ther.* 20 (2014) 582–590, <https://doi.org/10.1111/cns.12247>.
- M. Verduran, L. Zimmer, Hippocampal 5-HT1A receptor expression changes in prodromal stages of Alzheimer's disease: Beneficial or deleterious? *Neuropharmacology* 123 (2017) 446–454, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.06.021>.
- K. Mizukami, M. Ishikawa, H. Akatsu, E.E. Abrahamson, M.D. Ikonovic, T. Asada, An immunohistochemical study of the serotonin 1A receptor in the hippocampus of subjects with Alzheimer's disease, *Neuropathology* 31 (2011) 503–509, <https://doi.org/10.1111/j.1440-1789.2010.01193.x>.
- L.Y. Yeung, H.F. Kung, D.T. Yew, Localization of 5-HT1A and 5-HT2A positive cells in the brainstems of control age-matched and Alzheimer individuals, *Age (Omaha)* 32 (2010) 483–495, <https://doi.org/10.1007/s11357-010-9152-x>.
- N. Saigal, B. Easwaramoorthy, M. Nistor, D. Do, E. Head, J. Mukherjee, 18F-Meifway binding to serotonin 5HT1A receptors is reduced in transgenic mouse models of Alzheimer's disease, *J. Nucl. Med.* 48 (2007) 116P (Accessed May 6, 2020), https://jnm.snmjournals.org/cgi/content/short/48/supplement_2/116P-a.
- N. Hashemi-Frouzi, A. Komaki, S. Soleimani, S. Shahidi, The effects of the 5-HT7 receptor on hippocampal long-term potentiation and apoptosis in a rat model of Alzheimer's disease, *Brain Res. Bull.* 135 (2017) 85–91, <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.10.004>.
- G. Pérez-García, C. Gonzalez-Espinosa, A. Meneses, An mRNA expression analysis of stimulation and blockade of 5-HT7 receptors during memory consolidation, *Behav. Brain Res.* 169 (2006) 83–92, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.12.013>.
- B. De Filippis, V. Chiodi, W. Adriani, E. Lacivita, C. Mallozzi, M. Leopoldo, M. R. Domenici, A. Fuso, G. Laviola, Long-lasting beneficial effects of central serotonin receptor 7 stimulation in female mice modeling Rett syndrome, *Front. Behav. Neurosci.* 9 (2015) 1–11, <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00086>.
- Od Nih, Olaw Oer, GUIDE LABORATORY ANIMALS FOR THE CARE AND USE OF Eighth Edition Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals Institute for Laboratory Animal Research Division on Earth and Life Studies, 2011.
- R. Tellez, L. Gómez-Viquez, G. Lly-Salmeron, A. Meneses, GABA, glutamate, dopamine and serotonin transporters expression on for getting, *Neurobiol. Learn. Mem.* 98 (2012) 66–77, <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2012.05.001>.
- G. Lly-Salmeron, A. Meneses, Role of 5-HT1-7 receptors in short- and long-term memory for an autoshaping task: intrahippocampal manipulations, *Brain Res.* 1147 (2007) 140–147, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.02.007>.
- G. Perez-García, A. Meneses, Ex vivo study of 5-HT1A and 5-HT7 receptor agonists and antagonists on cAMP accumulation during memory formation and amnesia, *Behav. Brain Res.* 195 (2008) 139–146, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.07.033>.
- G. Pérez-García, C. Gonzalez-Espinosa, A. Meneses, An mRNA expression analysis of stimulation and blockade of 5-HT7 receptors during memory consolidation, *Behav. Brain Res.* 169 (2006) 83–92, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.12.013>.
- W. Adriani, D. Travaglini, E. Lacivita, L. Saso, M. Leopoldo, G. Laviola, Modulatory effects of two novel agonists for serotonin receptor 7 on emotion, motivation and circadian rhythm profiles in mice, *Neuropharmacology* 62 (2012) 833–842, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.09.012>.
- A. Meneses, Effects of the 5-HT 7 receptor antagonists SB-269970 and DR 4004 in autoshaping Pavlovian/instrumental learning task, *Behav. Brain Res.* 155 (2004) 275–282, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.04.026>.
- T. Freret, E. Paizanis, G. Beaudet, A. Gusmao-Montaigne, G. Nee, F. Dauphin, V. Bouet, M. Boulouard, Modulation of 5-HT7 receptor: effect on object recognition performances in mice, *Psychopharmacology (Berl.)* 231 (2014) 393–400, <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3247-x>.
- T. Sharp, S.R. Bramwell, D.G. Grahame-Smith, Effect of acute administration of L-tryptophan on the release of 5-HT in rat hippocampus in relation to serotonergic neuronal activity: An in vivo microdialysis study, *Life Sci.* 50 (1992) 1215–1223, [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(92\)90321-F](https://doi.org/10.1016/0024-3205(92)90321-F).
- P.B. Hedlund, M. Leopoldo, S. Caccia, G. Sarkisyan, C. Fracasso, G. Martelli, E. Lacivita, F. Berardi, R. Perrone, LP-211 is a brain penetrant selective agonist for the serotonin 5-HT7 receptor, *Neurosci. Lett.* 481 (2010) 12–16, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.06.036>.
- M. Naem, N.M. White, Parallel learning in an autoshaping paradigm, *Behav. Neurosci.* 130 (2016) 376–392, <https://doi.org/10.1037/bne0000154>.
- T. Myhrer, Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks, *Brain Res. Rev.* 41 (2003) 268–287, [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(02\)00268-0](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(02)00268-0).
- J.A. Quillfeldt, Behavioral methods to study learning and memory in rats. *Rodent Model As Tools Ethical Biomed. Res.*, Springer International Publishing, 2015, pp. 271–311, https://doi.org/10.1007/978-3-319-11578-8_17.
- P.L. Brown, H.M. Jenkins, Auto-Shaping of the Pigeon's key-peck 1, *J. Exp. Anal. Behav.* 11 (1968) 1–8, <https://doi.org/10.1901/j.eab.1968.11-1>.
- G. Manjarrez, E. Hernandez, A. Robles, J. Hernandez, N1/P2 component of auditory evoked potential reflect changes of the brain serotonin biosynthesis in rats, *Nutr. Neurosci.* 8 (2005) 213–218, <https://doi.org/10.1080/10284150500170971>.
- R. Meeusen, K. Thorré, F. Chaouloff, S. Sarre, K. De Meirille, G. Ebinger, Y. Michotte, Effects of tryptophan and/or acute running on extracellular 5-HT and 5-HIAA levels in the hippocampus of food-deprived rats, *Brain Res.* 740 (1996) 245–252, [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(96\)00872-4](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(96)00872-4).
- C.K.J. Lieben, K. Van Orsouw, N.E.P. Deutz, A. Blokland, Acute tryptophan depletion induced by a gelatin-based mixture impairs object memory but not affective behavior and spatial learning in the rat, *Behav. Brain Res.* 151 (2004) 53–64, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2003.08.002>.
- L.A.W. Jans, G.A.H. Korte-Bouws, S.M. Korte, A. Blokland, The effects of acute tryptophan depletion on affective behaviour and cognition in Brown Norway and Sprague Dawley rats, *J. Psychopharmacol.* 24 (2010) 605–614, <https://doi.org/10.1177/0269881108099424>.
- U. Renner, A. Zeug, A. Woehler, M. Niebert, A. Dityatev, G. Dityateva, N. Gorinski, D. Guseva, D. Abdel-Galil, M. Fröhlich, F. Döring, E. Wischmeyer, D.W. Richter, E. Neher, E.G. Ponimaskin, Heterodimerization of serotonin receptors 5-HT1A and 5-HT7 differentially regulates receptor signalling and trafficking, *J. Cell. Sci.* 125 (2012) 2486–2499, <https://doi.org/10.1242/jcs.101337>.
- O.M. Balcer, M.A. Seager, S.D. Gleason, X. Li, K. Rasmussen, J.K. Maxwell, G. Nomikos, A. Degroot, J.M. Witkin, Evaluation of 5-HT 7 receptor antagonism for the treatment of anxiety, depression, and schizophrenia through the use of receptor-deficient mice, *Behav. Brain Res.* 360 (2019) 270–278, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.12.019>.
- N. Madjid, E.E. Tottie, M. Lüttgen, B. Meister, J. Sandin, A. Kuzmin, O. Stiedl, S. O. Ögren, 5-Hydroxytryptamine 1A receptor blockade facilitates aversive learning in mice: Interactions with cholinergic and glutamatergic mechanisms, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316 (2006) 581–591, <https://doi.org/10.1124/jpet.105.092262>.
- E. Kvachina, G. Liu, A. Dityatev, U. Renner, A. Dumuis, D.W. Richter, G. Dityateva, M. Schachner, T.A. Voyno-Yasenetskaya, E.G. Ponimaskin, 5-HT7 receptor is coupled to G α subunits of heterotrimeric G12-protein to regulate gene transcription and neuronal morphology, *J. Neurosci.* 25 (2005) 7821–7830, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1790-05.2005>.
- F. Kobs, D. Guseva, T.P. Jensen, A. Wirth, U. Renner, D. Hess, M. Müller, L. Medrihan, W. Zhang, M. Zhang, K. Braun, S. Westerholz, A. Herzog,

- K. Radyushkin, A. El-Kordi, H. Ehrenreich, D.W. Richter, D.A. Rusakov, E. Ponimaskin, 5-HT 7R/G 12 signaling regulates neuronal morphology and function in an age-dependent manner, *J. Neurosci.* 32 (2012) 2915–2930, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2765-11.2012>.
- [44] M.S. Vasefi, K. Yang, J. Li, J.S. Kruk, J.J. Heikkilä, M.F. Jackson, J.F. Macdonald, M.A. Beazely, Acute 5-HT7 receptor activation increases NMDA-evoked currents and differentially alters NMDA receptor subunit phosphorylation and trafficking in hippocampal neurons, *Mol. Brain* 6 (2013) 24, <https://doi.org/10.1186/1756-6606-6-24>.
- [45] F. Andreetta, L. Carboni, G. Grafton, R. Jeggo, A.D. Whymant, M. Van Den Top, D. Hoyer, D. Spanswick, N.M. Barnes, Hippocampal 5-HT 7 Receptors Signal Phosphorylation of the GluA1 Subunit to Facilitate AMPA Receptor Mediated-Neurotransmission in Vitro and in Vivo Tables of Links, 2016, <https://doi.org/10.1111/bph.13432>.
- [46] D. Hoyer, D.E. Clarke, J.R. Fozard, P.R. Hartig, G.R. Martin, E.J. Mylecharane, P. R. Saxena, P.P.A. Humphrey VII, International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin), *Pharmacol. Rev.* 46 (1994) 157–203.
- [47] J.J. Hagan, G.W. Price, P. Jeffrey, N.J. Deeks, T. Stean, D. Piper, M.I. Smith, N. Upton, A.D. Medhurst, D.N. Middlemiss, G.J. Riley, P.J. Lovell, S.M. Bromidge, D.R. Thomas, Characterization of SB-269970-A, a selective 5-HT(7) receptor antagonist, *Br. J. Pharmacol.* 130 (2000) 539–548, <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703357>.