

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EVALUACIÓN DE LA MEMORIA ESPACIAL EN RATAS
ESTRESADAS Y TRATADAS CON AGONISTAS Y
ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR 5-HT₆”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ANAÍ DEL ROCÍO CAMPOS CONTRERAS

DIRIGIDA POR

Dra. GINA LORENA QUIRARTE

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2012



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EVALUACIÓN DE LA MEMORIA ESPACIAL EN RATAS
ESTRESADAS Y TRATADAS CON AGONISTAS Y
ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR 5-HT₆”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ANAÍ DEL ROCÍO CAMPOS CONTRERAS

DIRIGIDA POR

Dra. GINA LORENA QUIRARTE

SINODALES

Dra. GINA LORENA QUIRARTE
DIRECTOR

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN
SINODAL

Dr. CÉSAR IBARRA ALVARADO
SINODAL

Dr. ALFREDO BRIONES ARANDA
SINODAL

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi reconocimiento a las siguientes instituciones, unidades de apoyo y personas, por la gran ayuda que me brindaron para la realización de la presente tesis:

En particular agradezco a la Dra. Gina Lorena Quirarte por haberme permitido formar parte de su equipo de trabajo, consejos, orientación, asesoría y paciencia. A la invaluable asistencia técnica y académica de la M.V.Z. Norma Serafín, la Dra. Andrea C. Medina y el Sr. Ángel Méndez Olalde.

A los sinodales, la Dra. Laura Cristina Berumen Segura, el Dr. César Ibarra Alvarado y el Dr. Alfredo Briones Aranda por sus valiosas correcciones y asesoría en la redacción del trabajo.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por mi formación académica.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Aprendizaje y Memoria. A mis amigos de la Licenciatura por su compañía y guía en esta etapa de mi vida.

A mí amada familia que siempre me han apoyado en todas las decisiones que he tomado a lo largo de mi vida, por su cariño y por creer en mí.

Al Programa de Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPPIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (Proyecto PAPPIT-UNAM-IN214111). Al Consejo Nacional del Ciencia y Tecnología (CONACYT 130524) por el apoyo de investigación.

A la compañía ESTEVE por la donación de los fármacos.

A las unidades de apoyo:

Laboratorio de Aprendizaje y Memoria. Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva. Instituto de Neurobiología, Campus Juriquilla, Universidad Nacional Autónoma de México.

Bioterio, Instituto de Neurobiología, Campus Juriquilla, Universidad Nacional Autónoma de México.

Biblioteca, Instituto de Neurobiología, Campus Juriquilla, Universidad Nacional Autónoma de México.

“La vida no es la que uno vivió, sino lo que uno recuerda y cómo la recuerda para contarla”

Gabriel García Márquez

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1. Aprendizaje y memoria	1
1.1.1. Clasificación de la memoria	2
1.2. Plasticidad sináptica	4
1.3. Aprendizaje y memoria espacial	6
1.4. Estrés y su efecto en la memoria	7
1.5. El hipocampo	11
1.6. Sistema serotoninérgico	12
1.6.1. Inervación serotoninérgica del SNC	14
1.6.2. Receptores de serotonina	16
1.7. El receptor serotoninérgico 5-HT ₆	18
1.7.1. Características estructurales	18
1.7.2. Distribución de los receptores 5-HT ₆	19
1.7.3. Vías de transducción del receptor 5-HT ₆	20
1.7.4. Agonistas y antagonistas del receptor 5-HT ₆	22
1.7.5. Estudios con los agonistas y antagonistas del receptor 5-HT ₆	23
2. HIPÓTESIS	25
3. OBJETIVOS	26

3.1. General	26
3.2. Específicos	26
4. METODOLOGÍA	27
4.1. Materiales y métodos	27
4.1.1. Animales de experimentación	27
4.1.2. Manipulación	28
4.1.3. Nado forzado	28
4.1.4. Laberinto acuático de Morris	29
4.1.5. Sesión de entrenamiento	31
4.1.6. Administración del fármaco	31
4.1.7. Fármacos agonistas del receptor 5-HT ₆	32
4.1.8. Fármacos antagonistas del receptor 5-HT ₆	32
4.1.9. Prueba de transferencia a las 24 horas	33
4.2. Diseño Experimental	33
4.2.1. Experimento 1	33
4.2.2. Experimento 2	34
4.2.3. Experimento 3	34
4.3. Análisis estadístico	34
5. RESULTADOS	36
5.1. Experimento 1	36
5.1.1. Sesión de entrenamiento	36
5.1.2. Prueba de retención a las 24 h	37
5.2. Experimento 2	40
5.2.1. Sesión de entrenamiento	40
5.2.2. Prueba de retención a las 24 h	41

5.3. Experimento 3	44
5.3.1. Sesión de entrenamiento	44
5.3.2. Prueba de retención a las 24 h	45
6. DISCUSIÓN	49
7. CONCLUSIONES	53
8. REFERENCIAS	54

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Fármacos agonistas del receptor 5-HT ₆	32
2 Fármacos antagonistas del receptor 5-HT ₆	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1 Memoria de acuerdo a su temporalidad	3
2 Esquema de una sinapsis glutamatérgica	5
3 Circuitos activados por una situación estresante	8
4 Diagrama que representa el tiempo en que se puede aplicar el estrés con respecto a las fases de la memoria	10
5 Diagrama de la estructura y ubicación del hipocampo en el cerebro de la rata	11
6 Estructura química de la serotonina	13
7 Biosíntesis y metabolismo de la serotonina	14
8 Distribución esquemática de las principales vías de serotonina en el SNC de la rata	15
9 Modelo de la sinapsis serotoninérgica	17
10 Representación esquemática de la estructura tridimensional del receptor 5-HT ₆	19
11 Vía de transducción AMPc-CREB	21
12 Vía de señalización de ERK	22
13 Fotografía de una rata sometida al NF	28
14 Esquema del LAM con plataforma oculta	29
15 Esquema que indica la numeración de los puntos de salida en la sesión de entrenamiento en el LAM con plataforma oculta	30
16 Diagrama de la distribución de los sujetos en grupos: sin estrés (SE) y con estrés inducido por NF	35
17 Curvas de adquisición de la tarea espacial del LAM para los grupos control SE y control con estrés inducido por NF	37
18 Prueba de transferencia a las 24 horas de los grupos control SE y control con NF. A) Latencia de llegada a la zona. B) Tiempo de permanencia en el cuadrante. C) Frecuencia de entradas a la zona	39

19	Curvas de adquisición de la tarea espacial del LAM de los grupos SE	40
20	Latencia de llegada a la plataforma virtual de los grupos SE que recibieron tratamiento con los agonistas y antagonistas del receptor 5-HT ₆ en la prueba de retención a las 24 h	42
21	A) Tiempo de permanencia en el cuadrante en la prueba de retención a las 24 h de los grupos SE y que recibieron tratamiento con los fármacos agonistas y antagonistas del receptor 5-HT ₆ . B) Frecuencia de entradas a la zona en la prueba de retención	43
22	Curvas de adquisición de la tarea espacial del LAM de los grupos que fueron sometidos a NF	45
23	Latencia de llegada a la zona en la prueba de retención a las 24 h de los grupos que fueron sometidos a NF y recibieron tratamiento con los agonistas y antagonistas del receptor 5-HT ₆	47
24	A) Tiempo de permanencia en a la zona en la prueba de retención de los grupos sometidos NF, que recibieron tratamiento con los agonistas y antagonistas del receptor 5-HT ₆ . B) Frecuencia de entradas a la zona	48

RESUMEN

Existen numerosas evidencias que indican que tanto los antagonistas como los agonistas del receptor 5-HT₆, presentan efectos facilitadores sobre los procesos de aprendizaje y memoria. Se sabe que el receptor 5-HT₆ se encuentra distribuido en muchas áreas cerebrales y se ha demostrado que cuando se realiza una adrenalectomía se incrementa la expresión de este receptor en el hipocampo. El estrés agudo inducido por el nado forzado (NF) tiene la capacidad de modificar sistemas de neurotransmisión, incluyendo el serotoninérgico. En el presente trabajo se propuso determinar si el estrés agudo afecta la memoria a través del receptor 5-HT₆, el NF se utilizó como factor estresante agudo y el modelo de aprendizaje empleado fue el laberinto acuático de Morris (LAM) con plataforma oculta. Se realizaron tres experimentos; el primero tuvo como objetivo determinar la influencia del NF sobre el aprendizaje y la memoria espacial. Con esta finalidad, un grupo de ratas se sometió a estrés agudo durante 15 min, 24 h antes del entrenamiento. El segundo experimento consistió en administrar a ratas sin estrés (SE), inmediatamente después del aprendizaje, el agonista E-6801 (5 mg/kg; ip) o el E-6837 (5 mg/kg; ip) o el antagonista Ro 04-6790 (10 mg/kg; ip) o el SB-271046 (10 mg/kg; ip). En el tercer experimento, se sometieron a estrés agudo grupos independientes de ratas, 24 h después fueron entrenadas en el LAM y recibieron inmediatamente después los mismos tratamientos farmacológicos que se realizaron en el segundo experimento. La memoria de la tarea aprendida se midió 24 h después de que los animales fueron entrenados. Los resultados del primer experimento, indican que el estrés causa deterioro en la adquisición y retención de la tarea. Los resultados del segundo experimento, mostraron que ninguno de los tratamientos mejora la retención de la tarea de las ratas SE. El último experimento mostró deterioro en la retención de la tarea, el cual no fue bloqueado por ningún tratamiento; sin embargo, el grupo tratado con el agonista E-6801 mostró mayor latencia de llegada a la plataforma, así como un menor número de entradas a la zona blanco. Es probable que la ausencia de efectos sobre la memoria se deba a las dosis utilizadas y a la cantidad de glucocorticoides liberada durante la tarea.

1. ANTECEDENTES

1.1. Aprendizaje y memoria

El aprendizaje y la memoria son procesos que permiten la adaptación de los seres vivos a las modificaciones inciertas de su medio ambiente. Son procesos inherentes debido a que sin uno, no podría existir el otro (Morgado, 2005; Correa, 2007). Se han asociado a estos procesos diversas estructuras cerebrales, tales como la amígdala, la corteza cerebral y el hipocampo (Kandel y col., 2006).

El aprendizaje es el proceso mediante el cual ocurren cambios permanentes en la conducta como resultado de la experiencia que no se deben a las tendencias innatas de respuesta, maduración, fatiga, consumo de drogas o enfermedad (Hilgard y Marquis, 1961).

Al proceso por el cual se retiene o almacena la información adquirida, la cual puede ser recuperada a lo largo del tiempo, se le denomina memoria (Kandel y col., 2006). Este proceso permite que exista un sentido de continuidad en nuestras vidas (Morgado, 2005).

La memoria se divide en las siguientes fases:

- 1) Adquisición, es el momento en que el individuo obtiene información para ser recordada.
- 2) Consolidación, es la conversión de la información de memoria de corto plazo en memoria de largo plazo.
- 3) Evocación, es el proceso de recuperación de la información (Abel y Lattal, 2001; Collins, 2007).

Los estudios llevados a cabo durante las últimas décadas sobre los procesos cognitivos ofrecen un panorama que permite concluir que estos procesos involucran distintas estructuras cerebrales que actúan en forma conjunta, complementaria y especializada (Kandel y col., 2002); así mismo, se sabe que son influenciados por el estado emocional del individuo (McGaugh y Roozental, 2002).

1.1.1. Clasificación de la memoria

Desde la perspectiva de su contenido, la memoria se clasifica en memoria declarativa o explícita y en memoria no declarativa o implícita.

La memoria declarativa es el recuerdo consciente de las experiencias y hechos. A su vez, este tipo de memoria puede clasificarse en memoria episódica y memoria semántica. La primera se relaciona con el recuerdo de acontecimientos (detalles autobiográficos), mientras que la segunda tiene que ver con el recuerdo de hechos (Squire, 2004).

La memoria no declarativa se refiere a las habilidades motoras, hábitos y comportamientos que se recuerdan de manera involuntaria. Su expresión es en gran medida automática, inconsciente y difícil de verbalizar. Se adquiere gradualmente y se perfecciona con la práctica, por ejemplo: andar en bicicleta, conducir un auto, etc. (Kandel y col., 2002).

La primera clasificación de la memoria con base en su temporalidad data del siglo XIX y fue realizada por Hermann Ebbinghaus y años más tarde, William James formalizó esta clasificación e hizo la distinción entre dos tipos de memorias: memoria primaria y memoria secundaria (Prado-Alcalá y Quirarte, 2007).

Actualmente a estos tipos de memoria se les denomina memoria de corto plazo (MCP) y memoria de largo plazo (MLP) (Collins, 2007).

La MCP es la información que solamente estará disponible para su recuerdo durante segundos o minutos después del aprendizaje. Esta memoria es lábil y parece deberse a la actividad eléctrica del sistema nervioso, así como a los diferentes sistemas de neurotransmisión (Cruz-Morales, 2006).

La MLP es la información que se conserva durante días, semanas o incluso años. La conversión de la MCP a MLP depende de un proceso hipotético denominado consolidación. Se ha sugerido que esta conversión está sujeta a por lo menos dos factores dependientes de la experiencia: la importancia relativa que la información tiene para el organismo y la frecuencia con la que la información es captada por el sistema nervioso (Prado-Alcalá y col., 2004). El almacenamiento de este tipo de memoria requiere de la expresión de genes para la síntesis de nuevas proteínas y la formación de nuevas conexiones a nivel sináptico (Squire y Kandel, 2000; Lynch, 2004; Kandel y col., 2006).

Durante la evocación de la experiencia se activa la MLP que fue consolidada anteriormente (Figura 1).

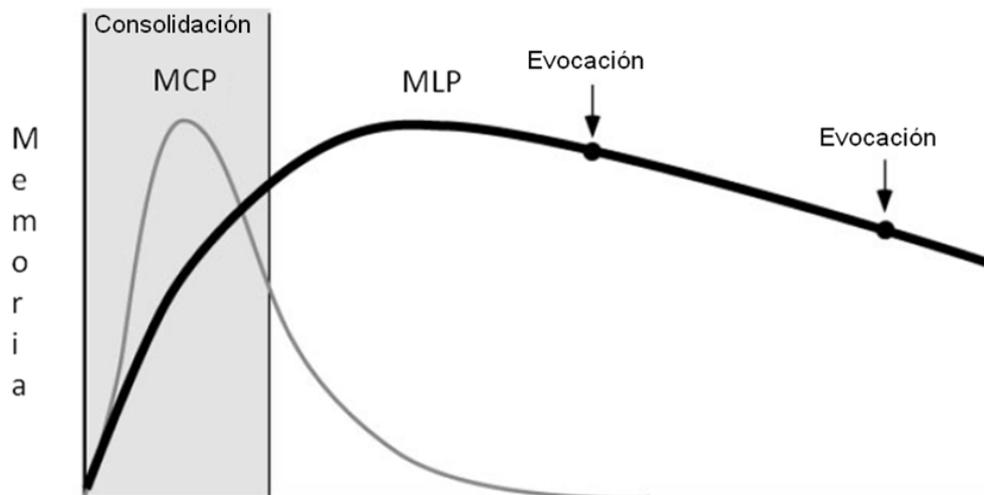


Figura 1. Memoria de acuerdo a su temporalidad. Memoria de corto plazo (MCP); Memoria de largo plazo (MLP). Modificado de Dudai, 2004.

1.2. Plasticidad sináptica

La plasticidad sináptica se refiere a la modificación de la fuerza o eficiencia de las conexiones sinápticas preexistentes. Se cree que está implicada decisivamente en el aprendizaje; así mismo, se ha propuesto que tiene un papel central en la capacidad del cerebro de formar memorias duraderas (Kandel y col., 2006; Citri y Malenka, 2008).

Se han utilizado con éxito dos modelos electrofisiológicos para el estudio de la plasticidad sináptica en el área CA1 del hipocampo: la potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés) que es la respuesta potenciada de las células postsinápticas por un periodo largo de tiempo, cuando se administra un estímulo de alta frecuencia a las fibras presinápticas; y la depresión a largo plazo (LTD, por sus siglas en inglés) que consiste en la reducción de la eficacia en la transmisión sináptica que puede durar horas o más. Se sabe que la inducción de estos modelos depende de la activación de los receptores glutamatérgicos N-metil-D-aspartato (NMDA) (Howland y Wang, 2008). El glutamato liberado por la neurona presináptica activa a los receptores AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico) y a los receptores NMDA, sin embargo, sólo los receptores AMPA son los responsables de la transmisión sináptica basal (Tsien, 2006).

Los receptores NMDA, en condiciones normales, se encuentran bloqueados por el ion Mg^{2+} . Estos receptores serán activados sólo cuando la neurona postsináptica sea despolarizada adecuadamente por un estímulo fuerte (cooperativo) proveniente de muchas neuronas presinápticas, lo que provoca que se libere el Mg^{2+} del poro del canal, cuando esto ocurre, el receptor NMDA se activa, permitiendo la entrada de Ca^{2+} (Figura 2). El influjo de Ca^{2+} inicia el aumento persistente de la transmisión sináptica activando a las cinasas dependientes de calcio, la cinasa calmodulina/ Ca^{2+} (CaMKII) y la proteincinasa C (PKC) (Kandel y col., 2002).

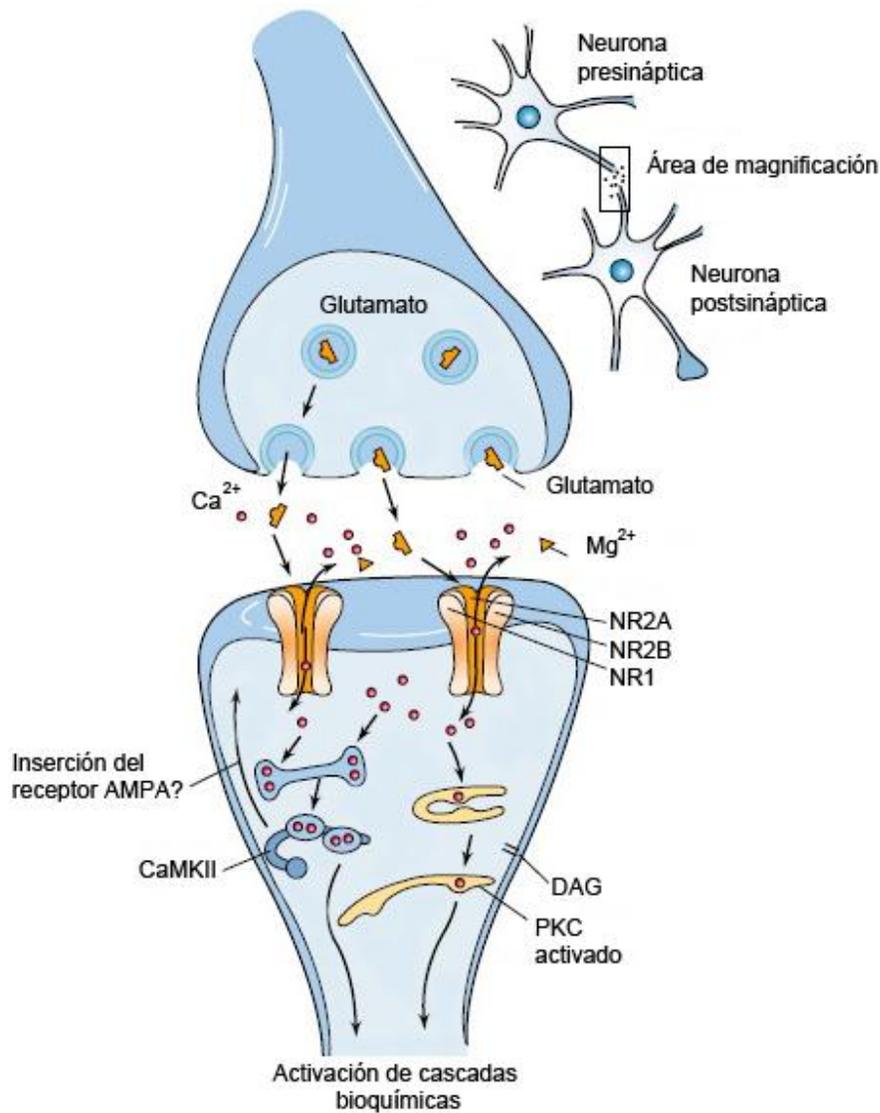


Figura 2. Esquema de una sinapsis glutamatérgica. El glutamato liberado de la terminales presinápticas activa a los receptores AMPA y NMDA. El flujo de Ca^{2+} es la señal para la inducción de la LTP Modificado de Tsien (2006).

Una vez iniciada la LTP, la célula postsináptica libera mensajeros retrogádicos que se cree que actúan sobre proteínas cinasas en la terminal presináptica para incrementar la liberación del transmisor que contribuye a la LTP (Kandel y col., 2002; Citri y Malenka, 2008). Asimismo, se ha propuesto que la CaMKII participa en el incremento de la fosforilación de los receptores AMPA y que influye en el

proceso de inserción de receptores adicionales de AMPA en la membrana de la neurona postsináptica (Squire y Kandel, 2000).

1.3. Aprendizaje y memoria espacial

El aprendizaje espacial se refiere a la solución de tareas que requieren asociaciones de características sensoriales del entorno, de manera que se codifiquen las relaciones entre los estímulos (Barnes, 1988).

Nos referimos a la memoria espacial como aquella con la que se realizan mapas mentales para ubicarse en el espacio y guiarnos a través de un lugar determinado. Este tipo de memoria forma parte de la memoria declarativa, ya que se puede formar una imagen mental del mapa que se utiliza (Squire y Kandel, 2000; Vicens y col., 2003).

Existen evidencias que sugieren que el hipocampo juega un papel crítico en la memoria declarativa y espacial en humanos y roedores (O'Keefe y Nadel, 1978). Se ha observado que cuando se produce un daño en esta estructura se provoca un notable deterioro en el aprendizaje espacial y el recuerdo de dicha información (Morris y col., 1982).

Para evaluar de forma experimental este tipo de aprendizaje en roedores, se utilizan laberintos cuya solución requiere de la ejecución de estrategias de navegación y de la información espacial disponible (Vicens y col., 2003).

Uno de los paradigmas más utilizados en el estudio de la memoria espacial en los roedores es el laberinto acuático de Morris (LAM), diseñado por Richard Morris. En la versión espacial de este laberinto, los animales tienen que nadar y usar la capacidad de recordar las pistas espaciales del entorno para localizar una plataforma oculta, cuya ubicación es constante durante los ensayos (Morris, 1984).

Entre las ventajas que brinda este paradigma, se encuentra el hecho de que no es necesaria la privación de agua o alimento a los animales, ni la aplicación de una descarga eléctrica para motivar la conducta. Sin embargo, es importante evitar que los animales usen claves no espaciales. Además, se requieren relativamente pocos ensayos para que los animales aprendan y se puedan valorar los efectos de los fármacos sobre los procesos de aprendizaje y memoria de forma más efectiva que en otros laberintos de adquisición más lenta (Vicens y col., 2003).

En 1982, Morris y col. realizaron un experimento en el que corroboraron el papel del hipocampo en la navegación espacial. Entrenaron grupos de ratas en el LAM, un grupo con lesión hipocampal y otro sin lesión. Los animales con lesión en el hipocampo mostraron una deficiencia significativa en la ejecución de la tarea de navegación espacial; sin embargo, a través de los ensayos del entrenamiento mejoraron su desempeño, pero nunca llegaron al lugar de escape antes que los animales sin lesión y mostraron un patrón de búsqueda desorientado.

1.4. Estrés y su efecto en la memoria

El estrés se define como cualquier condición que perturba seriamente la homeostasis fisiológica y psicológica de un individuo. Es considerado un potente modulador de los procesos de aprendizaje y memoria (Sandi y col., 2001).

El estrés se produce a través de la activación de dos sistemas: el sistema nervioso autónomo (SNA) y el eje hipotálamo–hipofisario–adrenal (HPA), el cual libera glucocorticoides que activan receptores nucleares localizados en estructuras cerebrales (Sandi y Pinelo-Nava, 2007; Schwabe y col., 2010). Los principales neurotransmisores de estos sistemas son: las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) y los glucocorticoides, cortisol en humanos y la corticosterona en ratas (de Kloet y col., 2005; Jöels y col., 2006).

El eje HPA inicia en el hipotálamo, donde se encuentran las neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular (PVN), las cuales secretan la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la arginina vasopresina (AVP), dos hormonas peptídicas capaces de estimular la liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) en la hipófisis, lo que ocurre después de que el hipotálamo fue activado por una situación estresante (Figura 3). El incremento en los niveles de ACTH induce la producción de glucocorticoides (GCs) en la corteza adrenal (Sandi y col., 2003).

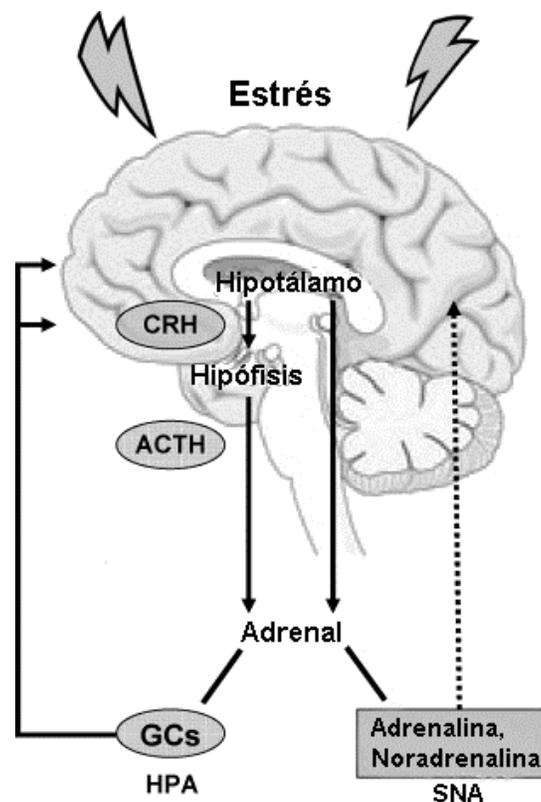


Figura 3. Circuitos activados por una situación estresante: el eje hipotálamo-hipofisiario-adrenal (HPA) y el sistema nervioso autónomo (SNA). Modificado de Schwabe y col., 2010.

La activación y la terminación de la respuesta al estrés son importantes, ya que el mantenimiento prolongado de altos niveles de estas hormonas, particularmente de los GCs, es altamente dañino. Los GCs desempeñan también un papel crítico en la terminación de su respuesta, ya que inhiben, por

retroalimentación negativa, la secreción de CRH y ACTH en el hipotálamo y en la hipófisis, respectivamente (Sandi y col., 2003).

Los GCs, debido a su naturaleza lipofílica, pueden atravesar fácilmente la barrera hematoencefálica (BHE) y llegar a distintas zonas del cerebro, donde ejercen diversas acciones, mediante la activación de receptores intracelulares: el Tipo I o mineralocorticoide (MR) y el Tipo II o glucocorticoide (GR). Los MRs presentan una afinidad diez veces mayor para unir la corticosterona (CORT) que los GRs, por lo que en condiciones fisiológicas los MRs se encuentran mayoritariamente activados. Mientras que la activación de los GRs requiere de la elevación de la concentración de los GCs, efecto que sucede en situaciones de estrés o miedo (Sandi y col., 2003; Wolf, 2003).

Se ha demostrado que los GCs influyen en los procesos de memoria y aprendizaje, ya que modulan la consolidación de la memoria que se produce durante una tarea de aprendizaje. Existe evidencia que indica que los efectos de la CORT sobre la memoria se comportan en forma de U-invertida, ya que niveles moderados de esta hormona facilitan la memoria y niveles bajos provocan bloqueo o deterioro en la misma (Sandi y Pinelo-Nava, 2007).

Así mismo, se ha comprobado que las hormonas adrenales tienen un papel importante en la consolidación de memorias duraderas (McGaugh y Roozental, 2002). Sin embargo, cuando el estrés es severo e incontrolable puede tener repercusiones negativas en los procesos previamente mencionados (Kim y col., 2006).

Los efectos del estrés sobre la memoria dependen de numerosos parámetros (Figura 4), entre los que se incluyen: la tarea de aprendizaje empleada, el tipo de estresor (intrínseco o extrínseco), el origen del estrés (físico o psicológico), la frecuencia del estímulo estresante (agudo, semi-agudo o crónico), el tiempo específico en que se somete el sujeto al estrés (previo a la adquisición,

después de la adquisición o antes de la evocación) y a factores del sujeto tales como el sexo o la edad (Sandi y Pinelo-Nava, 2007; Jöels y Baram, 2009; Cazakoff y col., 2010).

Se han reportado efectos opuestos de los GCs en la consolidación de la memoria y en la evocación. Si el estrés es provocado antes o después de la adquisición se observa un efecto facilitador en la consolidación de la memoria, por el contrario si el sujeto es sometido a estrés antes de la prueba de evocación se produce deterioro en la salida de la información (Roosendaal, 2002; Sandi y Pinelo-Nava, 2007; Ruetti y col., 2008).



Figura 4. Diagrama que representa el tiempo en que se puede aplicar el estrés con respecto a las fases de la memoria. 1) El estrés aplicado antes del aprendizaje (pre-entrenamiento) será reflejado en un aprendizaje modificado y/o la memoria, 2) El estrés aplicado sobre la consolidación tendrá efecto sobre este proceso y 3) El efecto del estrés después del aprendizaje (post-entrenamiento) se puede medir durante la evocación. Modificado de Sandi y Pinelo-Nava, 2007.

El nado forzado es un estímulo estresante físico y psicológico para los roedores; fue diseñado por Porsolt y col. en 1977, para evaluar el efecto de fármacos antidepresivos. Este paradigma produce ansiedad en roedores, al ser sometidos a una sola sesión con una duración de 15 min, 24 h antes de la valoración de la ansiedad (Briones-Arada y col., 2005). De igual forma, se ha comprobado que el estrés inducido por nado forzado tiene la capacidad de

modificar sistemas de neurotransmisión como el serotoninérgico en el hipocampo (Linthorst y Reul, 2007).

1.5. El hipocampo

El hipocampo es una estructura subcortical localizada en el lóbulo temporal del cerebro humano que forma parte del sistema límbico; en el hipocampo se pueden distinguir tres regiones celulares: el giro dentado (DG, por sus siglas en inglés), formado por células granulares, el cuerno de Amón (CA), formado por neuronas piramidales y que incluye los campos CA1, CA2 y CA3 y la región hiliar formada por células polimorfas (Figura 5) (Amaral y col., 2007).

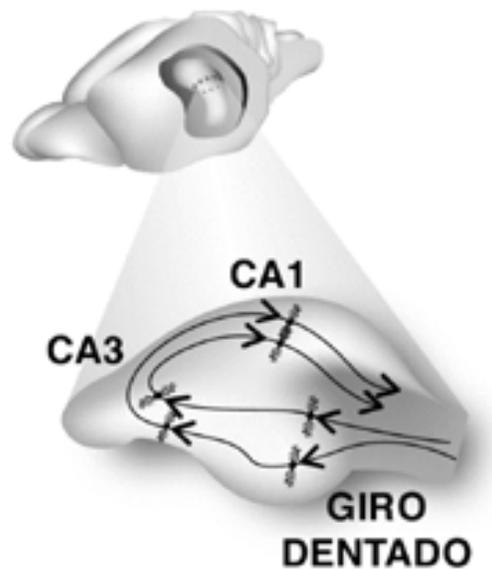


Figura 5. Diagrama de la estructura y ubicación del hipocampo en el cerebro de la rata.

El primer reporte clínico que involucró al hipocampo como una estructura fundamental para la formación de la memoria fue el de Brenda Milner en los años 60's acerca del paciente H.M., quien fue intervenido a los 27 años quirúrgicamente, debido a su epilepsia intratable; se removió la parte inferior y lateral del lóbulo temporal, con el objeto de eliminar las crisis convulsivas que el paciente

presentaba. A pesar de que el tratamiento logró un decremento en la frecuencia con que las crisis epilépticas se presentaban, el paciente mostró inmediatamente una severa y persistente amnesia anterógrada (incapacidad para almacenar nueva información) (Scoville y Milner, 1957).

Estudios posteriores, demostraron que en el paciente H.M. la memoria de procedimiento estaba intacta, ya que lograba recordar las tareas de tipo motor; sin embargo su memoria declarativa estaba seriamente dañada, por lo que H.M. era incapaz de recordar información previamente presentada de tipo consciente, y se relacionó esta deficiencia con el hipocampo, que fue una de las estructuras incluidas en la remoción quirúrgica del lóbulo temporal (Squire y Kandel, 2000).

Se sabe que el hipocampo está involucrado tanto en la regulación neuroendocrina del estrés como en la memoria. Es blanco de las hormonas liberadas por el estrés, ya que tiene una alta concentración de receptores a GCs (Morimoto, 1996).

Así mismo, se reportó una facilitación de la LTD en el hipocampo y un deterioro sobre la memoria espacial en ratas sometidas a estrés agudo inducido por un choque eléctrico o a la permanencia sobre una plataforma elevada, antes del aprendizaje en el LAM (Xiong y col., 2003).

1.6. Sistema serotoninérgico

La 5-Hidroxitriptamina (5-HT, serotonina) es un neurotransmisor que está implicado en una variedad de procesos fisiológicos, tanto a nivel de sistema nervioso central (SNC) como periférico (Souza y Craig, 2010). Es una amina biógena compuesta por un anillo indólico y una cadena lateral de etilamina (Figura 6). Se localiza y sintetiza en las células enterocromafines del tracto gastrointestinal y en neuronas del SNC (Azmitia, 2010).

La 5-HT en el SNC es sintetizada *in situ* a partir del aminoácido triptófano (Trp), el cual proviene principalmente de la dieta; este es incorporado por un mecanismo de transporte activo. El primer paso de la síntesis consiste en la hidroxilación del Trp por parte de la enzima triptófano hidroxilasa, obteniéndose L-5-Hidroxitriptófano (5-HTP); cabe mencionar que este paso es limitante para la síntesis. Posteriormente ocurre una descarboxilación por la L-aminoácido descarboxilasa obteniéndose así la 5-HT (Figura 7) (Souza y Craig, 2010).

Una vez sintetizada, la 5-HT es almacenada en vesículas dentro de la neurona para protegerla de la degradación de enzimas intracelulares como la monoamino oxidasa (MAO) (Mohammad-Zadeh y col., 2008; Nichols y Nichols, 2008).

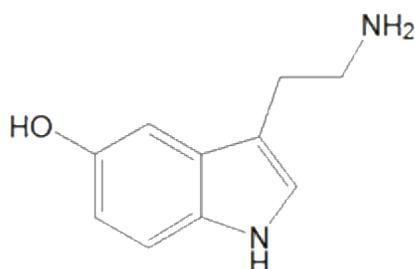


Figura 6. Estructura química de la serotonina

En el cerebro, la serotonina, producida dentro de las terminales de los axones en respuesta a un potencial de acción, se libera y difunde a través de la sinapsis para activar los receptores postsinápticos.

Esta molécula está involucrada en diversos procesos sensoriales, motores y conductuales (por ej. el sueño, el apetito, los ritmos circádicos, la conducta sexual, entre otros), así mismo se ha visto implicada en muchas patologías psiquiátricas (por ej. la ansiedad, la depresión, la esquizofrenia). Existe una vasta cantidad de literatura en la que se afirma la relación del sistema serotoninérgico en el control neurobiológico del aprendizaje y la memoria, tanto en individuos sanos como en

desórdenes patológicos (Meneses, 1999; Prado-Alcalá y col., 2003; Cassel, 2010; Souza y Craig, 2010; Berumen y col., 2012).

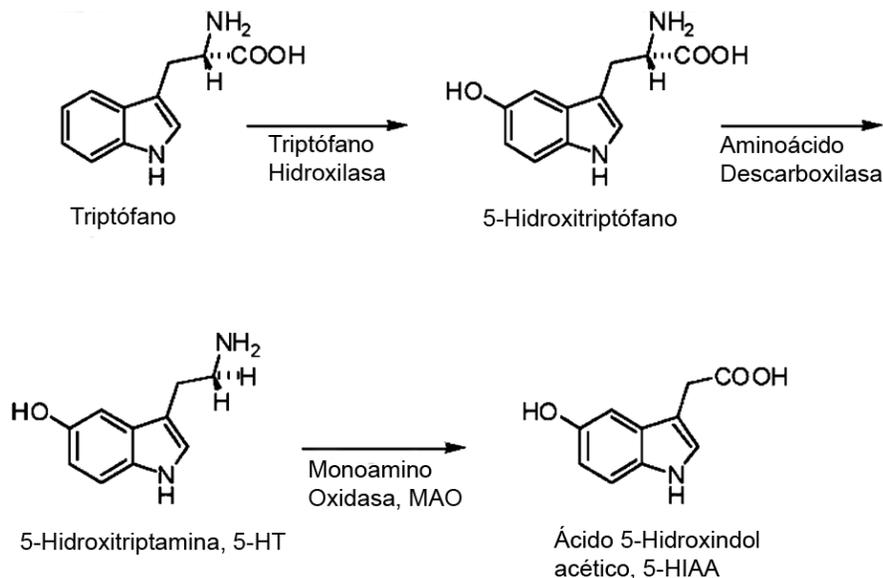


Figura 7. Biosíntesis y metabolismo de la serotonina. La serotonina es sintetizada a partir del aminoácido triptófano. La degradación de este neurotransmisor consiste en la desaminación de la cadena lateral por la enzima monoamino oxidasa (MAO). Modificado de Nichols y Nichols, 2008.

1.6.1. Inervación serotoninérgica del SNC

Los cuerpos celulares de las neuronas serotoninérgicas se localizan mayoritariamente en los núcleos del rafé (Figura 8). Desde un punto de vista ontogénico hay nueve grupos de neuronas serotoninérgicas en la región del rafé: B1 al B9 (Cooper y col., 2003; Hornung, 2010).

Los grupos del B₁ al B₄ son los más caudales y contienen un número pequeño de células serotoninérgicas. Estos núcleos dan lugar a axones serotoninérgicos con proyecciones dentro del tronco cerebral y la médula espinal. A un nivel más rostral existen grupos de células serotoninérgicas que constituyen los núcleos del B₅ al B₉ (Cooper y col., 2003).

El grupo más grande de neuronas serotoninérgicas lo constituye el grupo B₇ (rostral) que en conjunto con el grupo B₆ (caudal) más pequeño, conforman el núcleo dorsal del rafe (NDR). Otro gran grupo de células serotoninérgicas lo constituye el grupo B₈, que coincide con el núcleo medial del rafe (NMR), al igual que el grupo B₅ (Hornung, 2010).

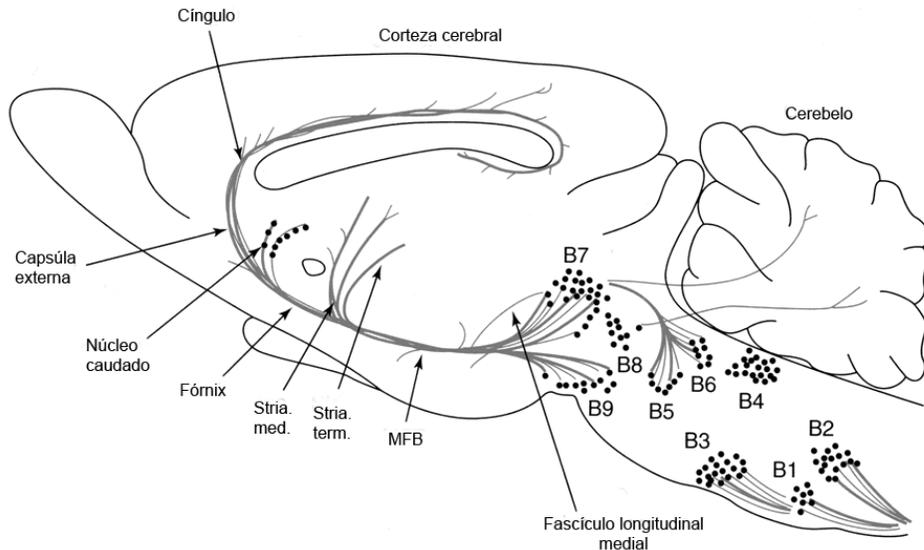


Figura 8. Distribución esquemática de las principales vías de serotonina en el SNC de la rata. B1 al B9 representan la ubicación de los diferentes núcleos que conforman el sistema del rafe. Stria. term., estria terminal; Stria. med., estria medial; Haz medial del prosencéfalo (MFB, por sus siglas en inglés). Modificado de Cooper y col., 2003.

Las proyecciones serotoninérgicas ascendentes inervan todo el cerebro anterior y provienen de los cuerpos del NDR, NMR y el grupo B₉. El NDR proyecta de forma preferente a estructuras motoras (estriado, sustancia negra y corteza frontal), mientras que el NMR inerva preferentemente a estructuras límbicas. A excepción del estriado y del hipocampo dorsal, todas las demás áreas cerebrales reciben aferencias de los dos núcleos, aunque en distinta proporción (Cooper y col., 2003).

Se ha demostrado mediante técnicas de autoradiografía y de inmunocitoquímica que el hipocampo recibe una inervación serotoninérgica

relativamente densa (Descarries y col., 2010). Se ha encontrado inervación serotoninérgica en el subículo, CA y DG de un total de 2.7×10^6 varicosidades por mm^3 , con una mayor proporción en el subículo seguida del CA (Oleskevich y Descarries, 1990).

1.6.2. Receptores de serotonina

La serotonina junto con su familia de receptores es uno de los más antiguos mecanismos moleculares de comunicación intercelular; se ha especulado que estos receptores quizás aparecieron desde hace más de 800 millones de años (Mengod y col., 2010).

La última clasificación de la Unión Internacional de Farmacología (IUPHAR) distingue 7 clases de receptores 5-HT (5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ y 5-HT₇), basándose en su diversidad estructural y en su principal sistema de transducción (Hoyer y col., 1994). Dentro de cada clase hay subtipos que comparten propiedades estructurales y el mismo sistema efector, pero con perfiles farmacológicos distintos. La mayoría de estos receptores pertenecen a la familia de los receptores metabotrópicos (se encuentran acoplados a proteínas G), a excepción de los receptores 5-HT₃, los cuales son ionotrópicos (transmiten su señal por medio de un canal iónico) (Mengod y col., 2010; Berumen y col., 2012).

La 5-HT, al ser liberada por la neurona presináptica en respuesta a un potencial de acción, activa a los receptores postsinápticos. Los autoreceptores presinápticos pueden responder a la presencia de 5-HT y regular su síntesis y liberación del axón presináptico. Por otra parte, la 5-HT es removida del espacio sináptico por proteínas especializadas localizadas en la membrana presináptica y es transportada nuevamente al interior de la terminal presináptica (Figura 9). La unión de la 5-HT al transportador de recaptura es un mecanismo de retroalimentación negativa. El transportador de recaptura de serotonina (SERT) es el encargado de remover la serotonina hacia la neurona presináptica, donde será

empaquetada en vesículas para evitar su degradación (Mohammad-Zadeh y col., 2008; Nichols y Nichols, 2008).

La unión de la serotonina al receptor postsináptico conduce a la activación de la proteína heterotrimérica fijadora de GTP (proteína G), la cual está compuesta de una subunidad $G\alpha$ y un dímero $G\beta\gamma$ (Figura 9). La subunidad $G\alpha$ se clasifica en cuatro clases: $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_q$ y $G\alpha_{12/13}$; cada una activa o inhibe una proteína efectora, lo cual produce una respuesta diferente.

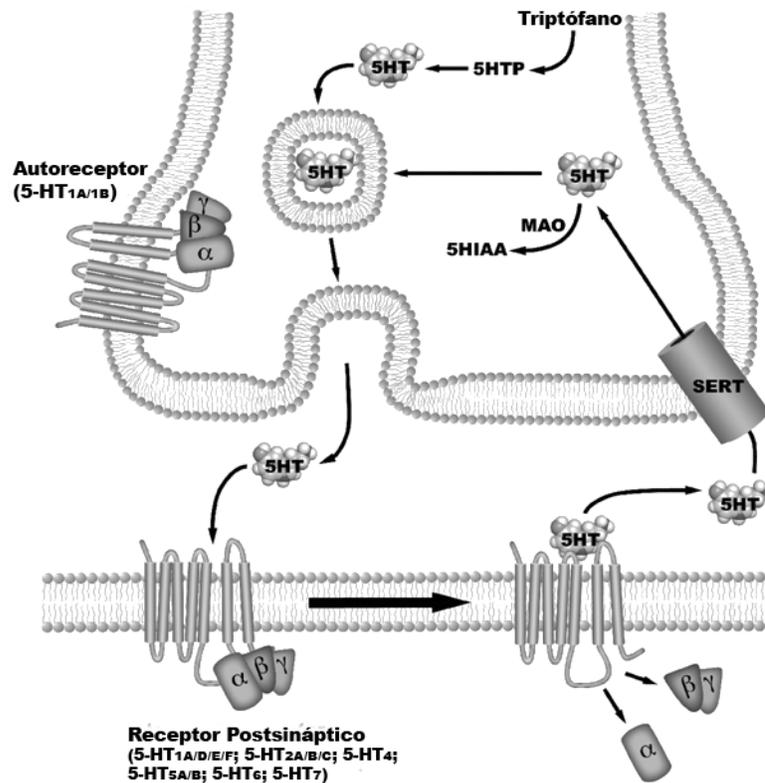


Figura 9. Modelo de la sinapsis serotoninérgica. Se observa el proceso de recaptura y liberación de la serotonina. Modificado de Nichols y Nichols, 2008.

Los receptores de serotonina se pueden clasificar de acuerdo a su mecanismo de señalización en: a) Receptor acoplado a $G\alpha_q$, b) Receptor acoplado a $G\alpha_{i/o}$, c) Receptor acoplado a $G\alpha_s$ y d) Receptor acoplado a canal iónico dependiente de ligando (Nichols y Nichols, 2008).

1.7. El receptor serotoninérgico 5-HT₆

El receptor 5-HT₆ es uno de los 14 receptores de la 5-HT, que ha sido clonado y caracterizado tanto en el humano (Kohen y col., 1996) como en la rata (Monsma y col., 1993; Ruat y col., 1993) y en el ratón (Kohen y col., 2001).

En 1993, dos equipos de investigadores independientes entre sí, clonaron un nuevo receptor de 5-HT en la rata que fue denominado 5-HT₆. Ambos equipos emplearon técnicas de biología molecular en sus experimentos; a pesar de que sus resultados fueron contradictorios, coincidieron en el hecho de que, una vez transfectado en dos linajes celulares distintos, se producía un aumento en la producción de AMPc, tras la estimulación con 5-HT (Monsma y col., 1993; Ruat y col., 1993; Woolley y col., 2004). Más tarde, fue re-secuenciado el gen que codifica al receptor, empleando el mismo clon usado por Monsma y col. y se encontró un polipéptido de 438 aminoácidos con un peso molecular de 46 kDa (Kohen y col., 1996).

Así mismo, el receptor 5-HT₆ de humano fue clonado (Kohen y col., 1996). Este receptor es un polipéptido de 440 aminoácidos, cuya farmacología y distribución es muy similar al receptor de rata. El mismo equipo clonó más tarde el receptor 5-HT₆ de ratón, que es también un péptido de 440 aminoácidos con un peso molecular de 47 kDa (Kohen y col., 2001; Woolley, 2004; Souza y Craig, 2010).

1.7.1. Características estructurales

El receptor 5-HT₆ posee un extremo N-terminal extracelular relativamente corto (27 aminoácidos), un tercer bucle citoplasmático (50 y 57 aminoácidos, en rata y humano, respectivamente) y un extremo C-terminal largo (117 y 120 aminoácidos en rata y en humano, respectivamente). En estas dos últimas zonas

existen varios residuos de serina y treonina que representan sitios potenciales de fosforilación por una proteína quinasa dependiente de AMPc o proteincinasa C (Woolley y col., 2004). Actualmente se sabe que este receptor está acoplado a una proteína $G_{\alpha s}$ por lo que activa a la adenilato ciclasa (AC) o a la fosfolipasa C (Woolley y col., 2004; Mitchell y Neumaier, 2005; Fone, 2008) (Figura, 10).

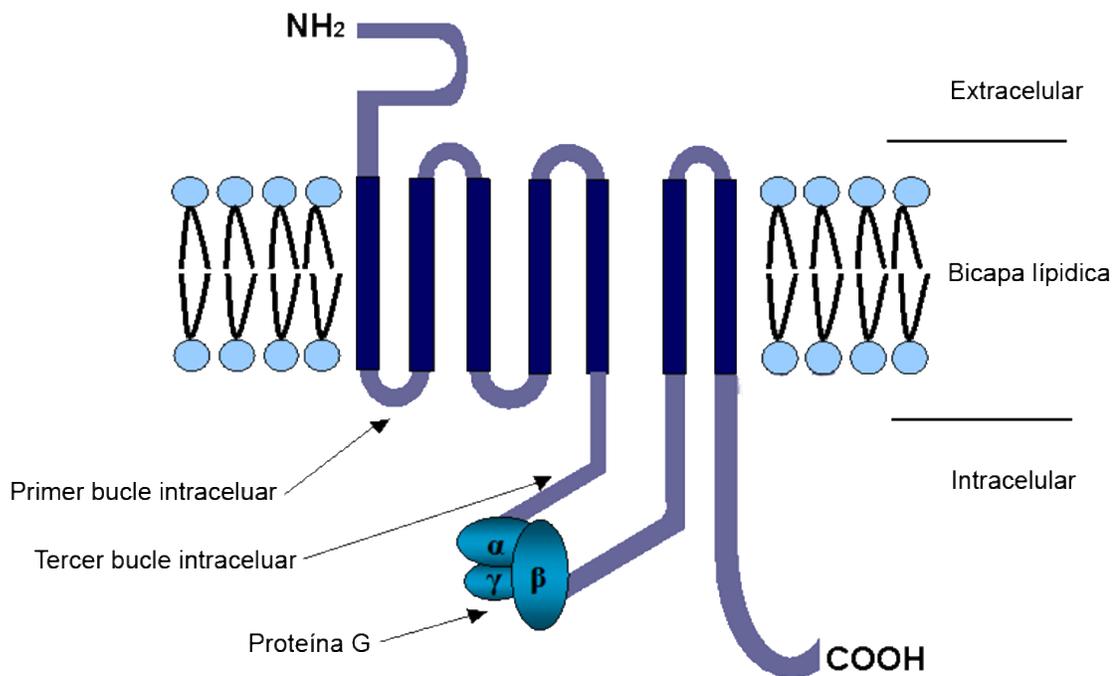


Figura 10. Representación esquemática de la estructura tridimensional del receptor 5-HT₆. Modificado de Woolley y col., 2004.

1.7.2. Distribución de los receptores 5-HT₆

Este receptor se localiza de manera exclusiva en el SNC, encontrándose una mayor expresión en el cuerpo estriado, el núcleo accumbens, la corteza cerebral y el túbulo olfatorio, además de estar presente en el hipocampo, el tálamo, la amígdala, el hipotálamo y el cerebelo (Woolley y col., 2004).

Gerard y col. (1996) lesionaron de manera selectiva la inervación del sistema serotoninérgico empleando la toxina 5,7-dihidroxitriptamina; a pesar de la lesión, los niveles de RNAm del receptor 5-HT₆ se mantuvieron intactos, lo que sugiere una localización postsináptica para el receptor 5-HT₆.

1.7.3. Vías de transducción del receptor 5-HT₆

Desde el descubrimiento del receptor 5-HT₆ se estableció su relación con la vía de señalización de AMPc-CREB a través de la activación de la proteína G α_s (Silva y col., 1998; Marcos y col., 2010), lo que provoca la sustitución de GDP por GTP en la subunidad α y se separa del complejo $\beta\gamma$. La subunidad G α junto con el GTP, activan a la AC, provocando la formación de AMPc a partir del ATP. De esta forma, se desencadena la vía de señalización de AMPc (Figura 11).

Posteriormente, el AMPc activa a la proteinquinasa dependiente del AMP cíclico (PKA). Al ser activada la PKA, ocurre la disociación de su unidad reguladora de la catabolizadora, permitiendo la traslocación de la segunda al interior del núcleo. Una vez al interior transfiere grupos fosfato para la activación de factores de transcripción como la proteína de unión al elemento responsivo de AMPc (CREB) que participa en la modulación de la transcripción de una gran variedad de genes que contiene sitios sensibles a ella, denominados CRE (elementos responsivos al AMPc) (Silva y col., 1998).

Por otra parte, se ha descrito la interacción de la región -C terminal del receptor 5-HT₆ con la tirosina quinasa fyn, a través de la cual se produce la activación de la vía de la quinasa regulada extracelular (ERK, por sus siglas en inglés) (Yun y col., 2007).

La cascada de ERK se inicia con la activación de la proteína de unión al GTP monomérica, Ras, la cual activa a la MAP quinasa, Raf o Rap-1. Cuando se activa

Raf, esta fosforila a la MAP cinasa extracelular del mitógeno (MEK, por sus siglas en inglés), MEK a su vez fosforila a ERK 1 y 2 en los residuos de treonina y tirosina. Una vez activado ERK, ejerce múltiples efectos río abajo, tales como la expresión de genes, la síntesis de proteínas, entre otros (Figura 12). Es importante mencionar que existen numerosos reguladores de la activación de la vía de ERK, todos aquellos neurotransmisores cuyos receptores están acoplados a AC o a PLC (Sweatt, 2004).

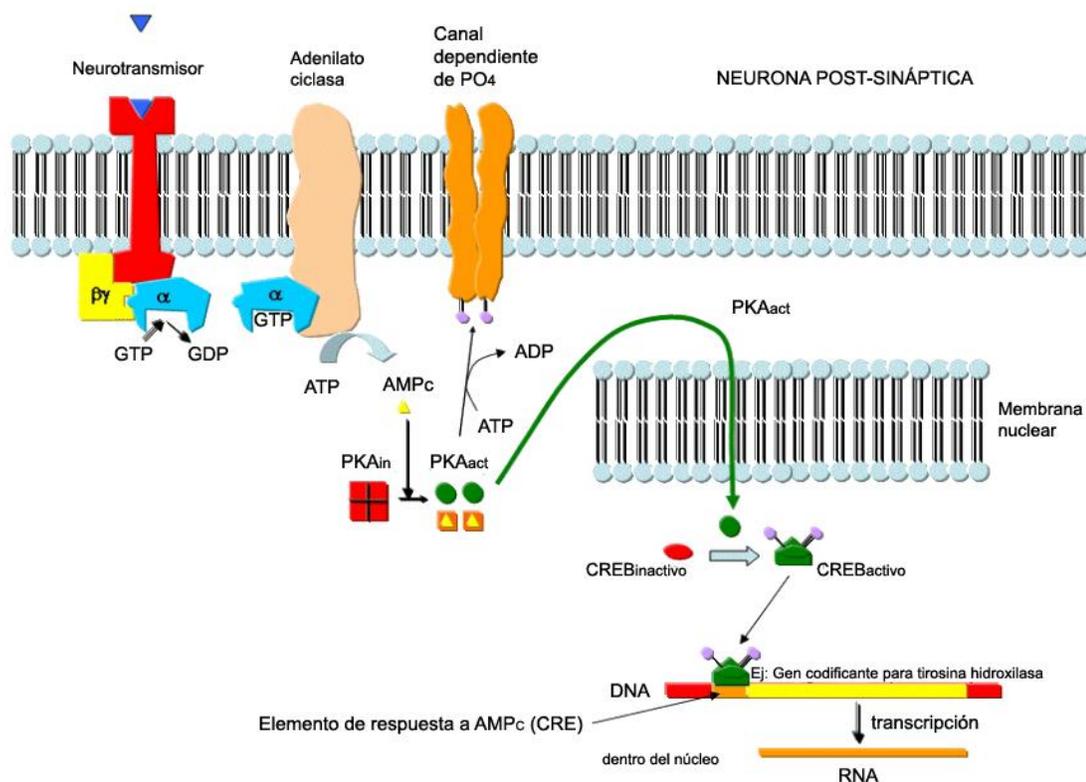


Figura 11. Vía de transducción AMPc-CREB. El neurotransmisor activa a la proteína G, que a su vez activa a la enzima adenilato ciclasa (AC) la cual induce la síntesis de AMPc, a través de ATP. El AMPc activa a la PKA que al trasladarse en el núcleo activa a la proteína CREB, induciendo la transcripción de genes. Modificado de Silva y col., 1998.

Diversos estudios han concluido que ERK juega un papel importante en varios tipos de LTP (Adams y Sweatt, 2002). Se ha demostrado que las ratas que han sido entrenadas en el LAM tienen un aumento en los niveles de ERK 1 y 2 en el hipocampo (Marcos y col., 2010).

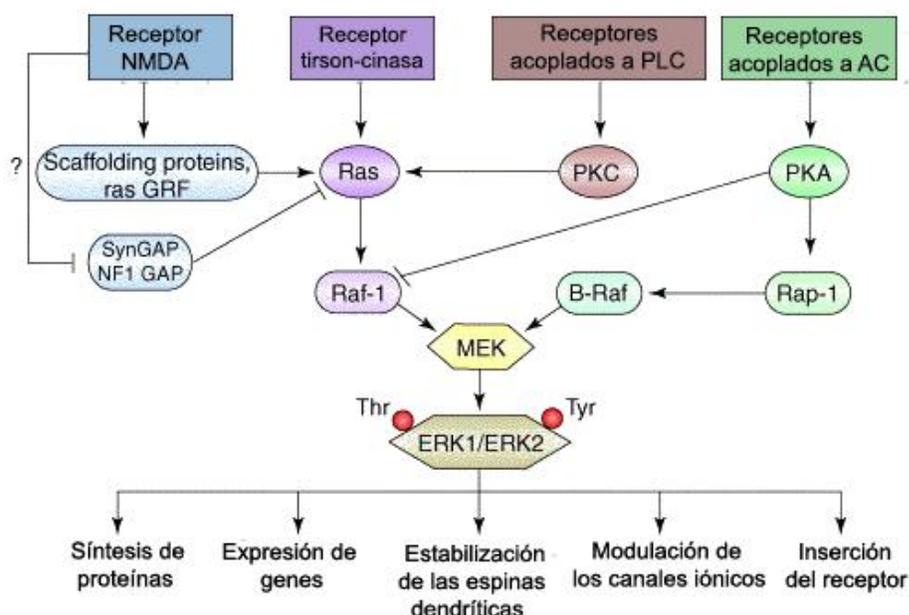


Figura 12. Vía de señalización de ERK. Modificado de Sweatt, 2004.

1.7.4. Agonistas y antagonistas del receptor 5-HT₆

Desde el descubrimiento del receptor 5-HT₆ fue necesaria la síntesis de ligandos selectivos al receptor para poder investigar su mecanismo de acción. De entre los primeros fármacos diseñados, se encuentran los antagonistas: Ro 04-6790 y SB-271046. Sin embargo hoy en día, existe una considerable cantidad de antagonistas y agonistas del receptor 5-HT₆.

Romero y col. (2006) evaluaron el comportamiento de dos nuevos ligandos selectivos: E-6801 y E-6837. Estos investigadores compararon también el efecto de estos nuevos componentes con el efecto producido por los antagonistas previamente mencionados. Sus resultados confirmaron que tanto E-6801 como E-6837 son agonistas parciales del receptor 5-HT₆, ya que inducen la formación de AMPc y al usar forskolina dicha respuesta se ve aumentada. Por el contrario, al emplear los fármacos Ro 04-6790 y SB-271046 se bloquea la formación de AMPc

y dicho efecto no se ve atenuado con la presencia de forskolina (Romero y col., 2006).

1.7.5. Estudios con los agonistas y antagonistas del receptor 5-HT₆

El estudio de este receptor ha despertado un gran interés debido a su participación en los procesos de aprendizaje y memoria (Mitchell y Neumaier, 2005; King, 2008; Codony, 2011).

Los primeros estudios funcionales relacionaron la actividad de este receptor con el sistema colinérgico, demostrando que los efectos observados sobre el comportamiento al bloquear este receptor, ya sea con oligonucleótidos antisentido o mediante antagonistas selectivos 5-HT₆ están mediados por cambios en la neurotransmisión colinérgica (Woolley y col., 2004).

Los antagonistas del receptor 5-HT₆ han mostrado mejorar la retención (Ro 04-6790) y la adquisición (SB-271046) de la información en diversos paradigmas de aprendizaje, incluyendo el LAM (Wooley y col., 2001; Marcos y col., 2010). Sin embargo, existen grupos de investigadores cuyos resultados no fueron consistentes con los efectos previamente mencionados de los antagonistas Ro-046790 y SB-271046 (Russel y Dias, 2002; Lindner y col., 2003).

Así mismo, Kendall y col. (2011) evaluaron el efecto del agonista E-6801 del receptor 5-HT₆ en la tarea de reconocimiento de objetos. Este fármaco mostró un efecto facilitador dependiente de la dosis, sobre la retención de la tarea. Además, al emplear dosis sub-efectivas del agonista E-6801 en conjunto con el antagonista SB-271046 se observaron efectos sinérgicos.

No obstante, se ha comprobado deterioro en la memoria instrumental al haber una sobreexpresión del receptor 5-HT₆ en el estriado de rata (Mitchell y col., 2007). Meneses y col. (2007) comprobaron que cuando se administra un

antagonista del sistema colinérgico o un antagonista glutamatérgico (sistemas relacionados con los procesos de memoria y aprendizaje), hay un aumento de la densidad de expresión de estos receptores en áreas hipocampales.

Por otra parte, se ha observado que algún factor derivado de la activación del eje HPA podría estar regulando el funcionamiento del receptor 5-HT₆, ya que se ha reportado un aumento en el RNA_m de este receptor en el área CA1 del hipocampo de ratas adrenalectomizadas (Yau y col., 1997; Marcos y col., 2008) y una disminución en la densidad de estos receptores en ratas que han sido sometidas a la prueba de LAM (Marcos y col., 2010), sugiriendo que los efectos del estrés en la consolidación de la memoria involucran la participación de los receptores 5-HT₆ en estos procesos.

En experimentos realizados en nuestro laboratorio hemos observado cómo la exposición a una situación de estrés agudo puede facilitar o deteriorar la memoria dependiendo del paradigma conductual empleado. En el caso de la tarea de reconocimiento de objetos, la MLP se ve deteriorada por el nado forzado, mientras que en la tarea de evitación inhibitoria la memoria se ve facilitada. Así mismo, se ha reportado la reversión de estos cambios por medio de la administración sistémica de agonistas o antagonistas del receptor 5-HT₆ en el caso del deterioro en la tarea de reconocimiento de objetos.

Estas evidencias nos motivaron a estudiar los efectos del estrés sobre la consolidación de la memoria espacial y la participación del sistema serotoninérgico a través de la manipulación farmacológica del receptor 5-HT₆.

2. HIPÓTESIS

El estrés agudo inducido por nado forzado previo al aprendizaje espacial en el LAM no afecta la adquisición. Sin embargo, el estrés provoca deterioro en la consolidación de la memoria espacial; este efecto es bloqueado por la administración intraperitoneal de agonistas y antagonistas del receptor 5-HT₆.

3. OBJETIVOS

3.1. General

Evaluar la participación de los receptores 5-HT₆ en la consolidación de la memoria espacial de la tarea del LAM en ratas sometidas a estrés agudo con NF antes del aprendizaje.

3.2. Específicos

- Determinar la influencia del estrés inducido por nado forzado sobre los procesos de aprendizaje y memoria en la tarea espacial de LAM.
- Evaluar el efecto de dos fármacos agonistas del receptor 5-HT₆ (E-6801 y E-6837) sobre la consolidación de la memoria espacial en ratas control y estresadas.
- Evaluar el efecto de dos fármacos antagonistas del receptor 5-HT₆ (Ro 04-6790 y SB-271046) sobre la consolidación de la memoria espacial en ratas control y estresadas.

4. METODOLOGÍA

Los experimentos fueron realizados en el laboratorio de Aprendizaje y Memoria que es parte de las instalaciones del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, ubicado en el Campus Juriquilla, Querétaro.

El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología, UNAM. Los procedimientos experimentales se realizaron acorde a las regulaciones establecidas por “El Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación de la Salud” de la Secretaría de Salud Pública y según la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 en materia de “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio” y de acuerdo a las normas estipuladas en la “Guide for Care and Use Laboratory Animals” del NIH (ILAR, 1996).

4.1. Materiales y métodos

4.1.1. Animales de experimentación

Se utilizaron 100 ratas macho de la cepa Wistar de 250 a 300 gramos de peso, obtenidas del bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla.

Los animales se transportaron al bioterio del laboratorio de Aprendizaje y Memoria, donde fueron colocados individualmente en cajas de acrílico transparentes (24 cm x 21 cm x 45 cm). Se mantuvieron en el bioterio a $\pm 22^{\circ}$ C de temperatura bajo condiciones controladas de luz-oscuridad (12h/12h) iniciando a las 7:00 h y con acceso libre a alimento y agua. Una semana después de haber llegado las ratas al bioterio se realizaron los experimentos. Cada sujeto fue

asignado de manera aleatoria a uno de los diferentes grupos contemplados en el protocolo. Todos los procedimientos experimentales se realizaron entre las 8:00 y las 15:00 horas, durante los niveles más bajos del ciclo de corticosterona de la rata.

4.1.2. Manipulación

Transcurrida la primera semana de adaptación a las condiciones del bioterio del laboratorio de Memoria y Aprendizaje, se procedió con la manipulación de los animales de experimentación. Este proceso consistió de tres sesiones con una duración de 2 a 4 minutos en la que se toma a cada una de las ratas y se le dan suaves masajes en el dorso. El objetivo fue la disminución del posible efecto que genere la presencia del experimentador sobre la conducta de los animales.

4.1.3. Nado forzado

Se utilizó una versión modificada del modelo de nado forzado (NF) de Porsolt y col. (1978) para la generación de estrés agudo en los sujetos de prueba. El procedimiento consistió en colocar a cada rata en un tubo de acrílico de 45 cm de altura y 20 cm de diámetro, que se llena con agua a una temperatura de 25°C (Figura 13). La duración del ensayo fue de 15 minutos. Finalizado el ensayo, cada rata fue secada y colocada en una caja de acrílico permitiéndole descansar aproximadamente 15 minutos. El agua del tubo se cambió cada dos ensayos. Los sujetos fueron sometidos a NF 24 horas previas al aprendizaje.



Figura 13. Fotografía de una rata sometida al nado forzado (NF).

4.1.4. Laberinto acuático de Morris

Se utilizó el laberinto acuático de Morris (LAM) para evaluar la memoria espacial de las ratas (Morris, 1984). El LAM consiste en un tanque circular de plástico negro de 154 cm de diámetro, con una altura de 60 cm y una base de metal que lo sostiene de una altura de 58 cm (Figura 14). El tanque fue llenado con agua a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ para evitar la hipotermia que se adquiere al nadar y los altos niveles de corticosterona que se han comprobado por Sandi y col. (1997) en ratas que se someten al LAM con agua a una temperatura menor.

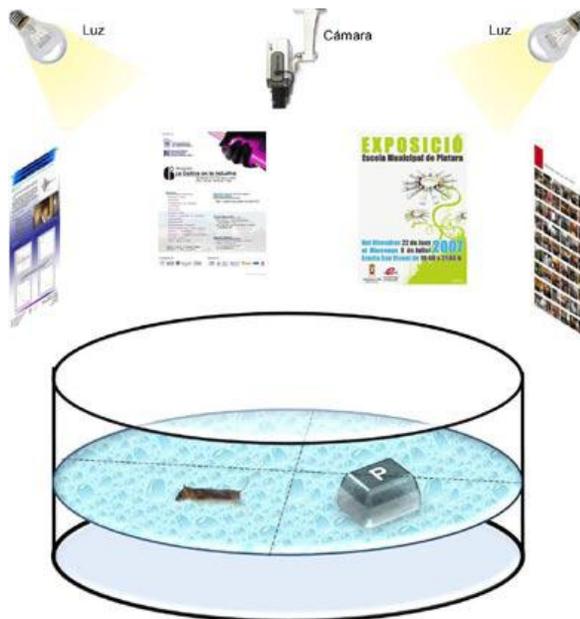


Figura 14. Esquema del LAM con plataforma oculta.

El tanque se divide funcionalmente en cuatro cuadrantes de áreas similares a partir de la intersección con los puntos cardinales; de estos puntos es donde el roedor es liberado en cada ensayo del entrenamiento (Figura 15). Se colocaron pistas visuales alrededor del laberinto con la finalidad de que sirvieran para la orientación de los animales.

En medio de uno de los cuadrantes (cuadrante blanco) se colocó una plataforma de escape cuadrada de acrílico negra (11.7 x 11.7 cm) que quedó sumergida a 1 cm debajo del nivel del agua, misma que permaneció constante en cada ensayo. Dicho lugar es denominado zona blanco o zona de escape. Los roedores aprenden a localizar la plataforma oculta a lo largo de los ensayos repetitivos.

El cuarto en el que se encuentra el tanque tiene una dimensión de 236 cm x 225 cm x 242 cm y es sonoamortiguado. La iluminación del cuarto de experimentación fue provista por lámparas equidistantes. En el techo del tanque se encuentra una cámara que registra la trayectoria del nado de la rata. Los experimentos fueron registrados con el sistema computacional SMART 3.0 (SMART, San Diego Instruments).

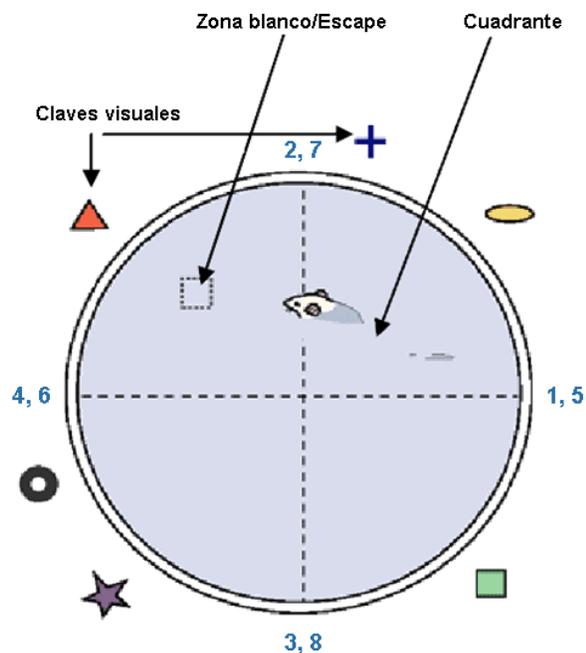


Figura 15. Esquema que indica la numeración de los puntos de salida en la sesión de entrenamiento en el LAM con plataforma oculta.

4.1.5. Sesión de entrenamiento

Se utilizó la versión espacial del LAM, en la que la plataforma se mantiene oculta en medio de uno de los cuadrantes.

La sesión de adquisición consistió en una única sesión para cada sujeto, con un total de ocho ensayos. Cada ensayo tuvo un máximo de duración de 60 s, donde el animal fue colocado en el laberinto con el hocico apuntando hacia las paredes de la tina para que busque la plataforma de escape. La numeración utilizada para los puntos de salida se indica en la Figura 15. Sólo en el primer ensayo, si la rata no encontraba la plataforma, fue guiada y colocada manualmente por el experimentador en la plataforma, permaneciendo allí por 20 s. En los siguientes ensayos la rata debería encontrar por sí misma la plataforma oculta, de ser así, se le permitió permanecer en la plataforma por 20 s con la finalidad de que observara su entorno. Después de cada ensayo se retiró a la rata de la plataforma o del agua y se le colocó en una caja de acrílico, permitiéndosele descansar durante 30 s y posteriormente se inicio el siguiente ensayo.

La latencia de escape a la plataforma fue registrada y usada como una medida para la adquisición; este parámetro fue dado por el análisis del programa computacional SMART, 3.0 (San Diego Instruments).

4.1.6. Administración del fármaco

Para estudiar el proceso de consolidación se inyectó solución salina o el fármaco vía intraperitoneal inmediatamente después de finalizar la sesión de entrenamiento por parte del sujeto. Se administró la dosis correspondiente a cada sujeto del agonista (5 mg/kg), o del antagonista (10 mg/kg) del receptor 5-HT₆, o en caso de formar parte del grupo control el vehículo (solución salina).

4.1.7. Fármacos agonistas del receptor 5-HT₆

Se administró a los sujetos por vía intraperitoneal los fármacos agonistas del receptor 5-HT₆ (Cuadro 1).

Cuadro 1. Fármacos agonistas del receptor 5-HT₆

Fármaco	Dosis
E-6801 (6-cloro- <i>N</i> -(3-(2-(dimetilamino)etil)-1 <i>H</i> -indol-5-il)imidazo[2,1- <i>b</i>]tiazol-5-sulfonamida)	5 mg/kg
E-6837 (5-cloro- <i>N</i> -(3-(2-(dimetilamino) etil)-1 <i>H</i> -indol-5-il)naftaleno-2-sulfonamida)	5 mg/kg

Los fármacos fueron preparados justo antes de la sesión de entrenamiento en el LAM. Los compuestos se disolvieron en solución salina isotónica y se agregó polietilenglicol como conjugante.

4.1.8. Fármacos antagonistas del receptor 5-HT₆

Se administró a los sujetos por vía intraperitoneal los fármacos antagonistas del receptor 5-HT₆ (Cuadro 2).

Cuadro 2. Fármacos antagonistas del receptor 5-HT₆

Fármaco	Dosis
SB-271046 (5-cloro- <i>N</i> -[4-metoxi-3-(1-piperazinil)fenil]-3-metil-benzo[<i>b</i>]tiofeno-2-sulfonamida)	10 mg/kg
Ro 04-6790 4-Amino- <i>N</i> -[2,6-bis(metilamino)-4-pirimidinil]-bencensulfonamida	10 mg/kg

Los fármacos fueron preparados justo antes de la sesión de entrenamiento en el LAM. Los compuestos se disolvieron en solución salina isotónica y se agregó polietilenglicol como conjugante.

4.1.9. Prueba de transferencia a las 24 horas

La prueba de transferencia fue evaluada a las 24 horas después de la fase de adquisición. Esta prueba consistió en la colocación del sujeto en el laberinto acuático durante 60 s, sin plataforma. Esta es una prueba de preferencia espacial en la que si el animal aprendió nadará más tiempo en el cuadrante blanco, es decir donde previamente se situaba la plataforma.

Se cuantificó el tiempo que el sujeto nada en el cuadrante blanco, la latencia de llegada a la zona blanco (zona donde previamente se encontraba la plataforma) y la frecuencia de entradas a la zona blanco. Dichos parámetros fueron usados como una medida de la retención y fueron dados por el análisis del programa computacional SMART 3.0 (SMART, San Diego, Instruments).

4.2. Diseño Experimental

4.2.1. Experimento 1

El primer experimento se realizó con la finalidad de valorar la influencia del estrés inducido por nado forzado (NF) sobre el aprendizaje y la memoria espacial. Se formaron dos grupos de 10 sujetos cada uno. El primer grupo consistió en ratas sin estrés (SE) y el segundo fue sometido a estrés por NF (Figura 16). Ambos grupos fueron entrenados en el LAM. Al finalizar el entrenamiento, los animales recibieron la administración del vehículo (solución salina) por vía intraperitoneal. La prueba de transferencia se realizó a las 24 horas.

4.2.2. Experimento 2

El segundo experimento sirvió para evaluar el efecto de dos agonistas (E-6801 y E-6837) y dos antagonistas (Ro 04-6790 y SB-271046) del receptor 5-HT₆ en ratas sin estrés (SE). Se formaron cuatro grupos, uno para cada tratamiento (Figura 16). Todos los grupos fueron entrenados en el LAM. Al finalizar el entrenamiento, se administró vía intraperitoneal el agonista correspondiente a cada grupo a una dosis de 5 mg/kg y en caso de formar parte de los grupos tratados con los antagonistas la dosis fue de 10 mg/kg. La prueba de transferencia se realizó a las 24 horas.

4.2.3. Experimento 3

El tercer experimento sirvió para evaluar el efecto de dos fármacos agonistas (E-6801 y E-6837) y dos antagonistas (Ro 04-6790 y SB-271046) del receptor 5-HT₆ en ratas sometidas a estrés por NF. Se formaron cuatro grupos, uno para cada tratamiento (Figura 16). Todos los grupos fueron entrenados en el LAM. Al finalizar el entrenamiento, se administró por vía intraperitoneal el agonista correspondiente a cada grupo a una dosis de 5 mg/kg y en caso de formar parte de los grupos tratados con los antagonistas la dosis fue de 10 mg/kg. La prueba de transferencia se realizó a las 24 horas.

4.3. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados mediante pruebas de análisis de varianza (ANOVA) de dos vías de medidas repetidas para los datos del entrenamiento. Cuando el caso lo permitió (si el ANOVA arrojó una $p < 0.05$), se realizaron pruebas post hoc LSD de Fisher.

Se realizó una ANOVA de dos vías de medidas repetidas para comparar los parámetros en la zona blanco y la zona opuesta de la prueba de retención a las 24 h, de los grupos control SE y del control NF; en caso de encontrar diferencias significativas, es decir una $p < 0.05$, se realizaron pruebas pos hoc LSD de Fisher.

Así mismo, se realizó un ANOVA de una vía para los parámetros en la zona blanco del día de la prueba de retención a las 24 h de los distintos tratamientos. Cuando el caso lo permitió (si el análisis arrojó una $p < 0.05$), se realizaron pruebas post hoc LSD de Fisher. Cuando los datos no cumplieron la normalidad e igualdad de varianzas, se realizaron pruebas no paramétricas (Kruskal-Wallis); en caso de encontrar diferencias significativas, es decir una $p < 0.05$, se realizó la prueba post hoc U de Mann-Whitney. Para la comparación de cada grupo de manera independiente, es decir la zona blanco contra la opuesta, se realizaron pruebas de Wilcoxon.

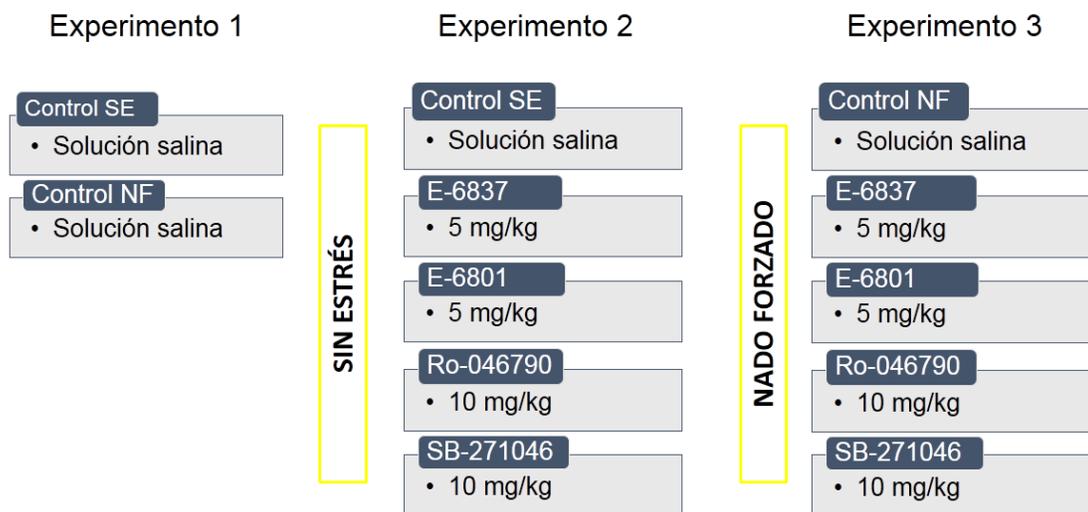


Figura 16. Diagrama de la distribución de los sujetos en grupos: sin estrés (SE) y con estrés inducido por nado forzado (NF).

5. RESULTADOS

5.1. Experimento 1

5.1.1. Sesión de entrenamiento

Con la finalidad de determinar si las ratas aprendieron la tarea de LAM, se analizó la diferencia entre el tiempo de la latencia de escape (tiempo de llegada a la plataforma oculta) registrada durante el ensayo 1 y cada uno de los ensayos subsecuentes. Esta comparación nos permite conocer el momento en el que los sujetos disminuyen significativamente su latencia de escape lo cual representa un cambio en la conducta. Cuando es observada tal disminución, se infiere que la rata aprendió la tarea.

Las latencias de escape durante los ocho ensayos del entrenamiento de los grupos control sin estrés (SE) y control con nado forzado (NF), fueron analizadas utilizando la prueba de ANOVA de dos vías con medidas repetidas [Factor A= tratamientos (SE vs. NF); Factor B= ensayos (cada uno de los 8 ensayos)]. El análisis de varianza arrojó diferencias significativas entre los grupos, lo que demuestra que el estrés tiene un efecto en la adquisición de la tarea ($F_{1, 126} = 4.772$; $p < 0.05$). Los sujetos del grupo NF tardaron más en aprender la tarea, ya que la mayoría de las latencias de escape a la plataforma de este grupo son mayores que las del grupo control SE. Por otra parte, la prueba mostró diferencias estadísticamente significativas entre las latencias de escape de los ocho ensayos del entrenamiento ($F_{7, 126} = 13.457$; $p < 0.001$). Sin embargo, no se encontraron diferencias entre la interacción del ensayo y los tratamientos ($F_{7, 126} = 0.809$; $p = 0.582$).

Al realizar la prueba post hoc LSD de Fisher se detectaron diferencias entre las latencias de escape a lo largo de los ensayos. La comparación de las latencias de escape del ensayo 1 y del ensayo 8 del grupo control SE mostró diferencias

significativas ($p < 0.01$); de igual forma la prueba arrojó diferencias significativas entre el ensayo 1 y el ensayo 8 del grupo NF ($p < 0.01$) como se observa en la Figura 17. Por otra parte, al analizar las latencias de escape del ensayo 8 de los dos grupos, utilizando la prueba post hoc LSD de Fisher, se encontraron diferencias significativas entre ellos ($p < 0.05$).

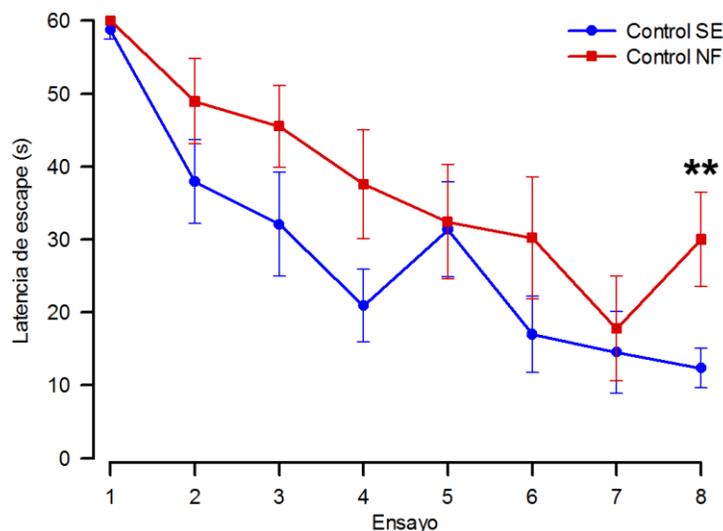


Figura 17. Curvas de adquisición de la tarea espacial del LAM para los grupos control sin estrés (SE) y control con estrés inducido por nado forzado (NF). Los datos se expresan como la media \pm error estándar de la media (EEM). El * indica la diferencia significativa entre el ensayo 4 de los grupos ** $p < 0.05$. Los ** indican la diferencia significativa entre el ensayo 1 y el ensayo 8 del entrenamiento ** $p < 0.01$. El tamaño de los grupos fue de $n=10$ ratas.

5.1.2. Prueba de retención a las 24 horas

Con la finalidad de determinar si las ratas recordaron la tarea de LAM, se realizó el análisis de las latencias de llegada a la plataforma virtual (lugar donde se encontraba previamente la plataforma), el tiempo de nado en el cuadrante blanco y la frecuencia de entradas a la zona blanco. Cada parámetro se analizó de manera independiente y se comparó contra la zona opuesta; si la rata recuerda la tarea tendrá menor latencia de llegada a la zona blanco así como mayor tiempo de permanencia y número de entradas a la zona blanco. Para verificar esto, se realizó

el análisis de estos parámetros utilizando la prueba de ANOVA de dos vías con medidas repetidas [Factor A= tratamientos (SE vs. NF); Factor B= zonas (blanco vs. opuesto)].

El análisis de varianza del tiempo de llegada a la plataforma virtual, no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($F_{1, 18} = 1.796$; $p > 0.05$); sin embargo, se encontraron diferencias en el factor de las zonas ($F_{1, 18} = 15.05$; $p < 0.05$). Asimismo, se encontraron diferencias significativas en la interacción de los tratamientos y las zonas ($F_{1, 18} = 4.889$; $p < 0.05$).

Al aplicar la prueba post hoc LSD de Fisher se encontraron diferencias significativas entre la zona blanco y la zona opuesta del grupo control SE ($p < 0.01$), lo que sugiere que los animales recuerdan la tarea. Asimismo, la prueba arrojó diferencias entre la zona opuesta del grupo control SE contra la zona opuesta del grupo control NF ($p < 0.01$), el cual presenta una latencia de llegada a la zona opuesta menor que el grupo control SE. Por otra parte, no se mostraron diferencias significativas entre la zona blanco y la zona opuesta ($p > 0.05$) del grupo control NF, lo que indica que éste grupo no recuerda la tarea (Figura 18 A).

El análisis estadístico del tiempo de permanencia en el cuadrante blanco contra el tiempo de permanencia en el cuadrante opuesto de los grupos control SE y control NF no mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($F_{1, 18} = 0.932$; $p > 0.05$) pero las hubo en el factor de las zonas ($F_{1, 18} = 12.86$; $p < 0.01$). Sin embargo, no se encontraron diferencias en la interacción del tratamiento y la zona ($F_{1, 18} = 0.680$; $p > 0.05$).

La prueba post hoc LSD de Fisher arrojó diferencias significativas entre el cuadrante blanco y el opuesto del grupo control SE ($p < 0.01$). Por el contrario, la prueba no mostró diferencias significativas entre el cuadrante blanco y el opuesto del grupo control NF ($p > 0.05$), lo que sugiere que éste grupo no recuerda la tarea,

ya que pasan tiempo de permanencia similar en la zona blanco y la zona opuesta (Figura 18 B).

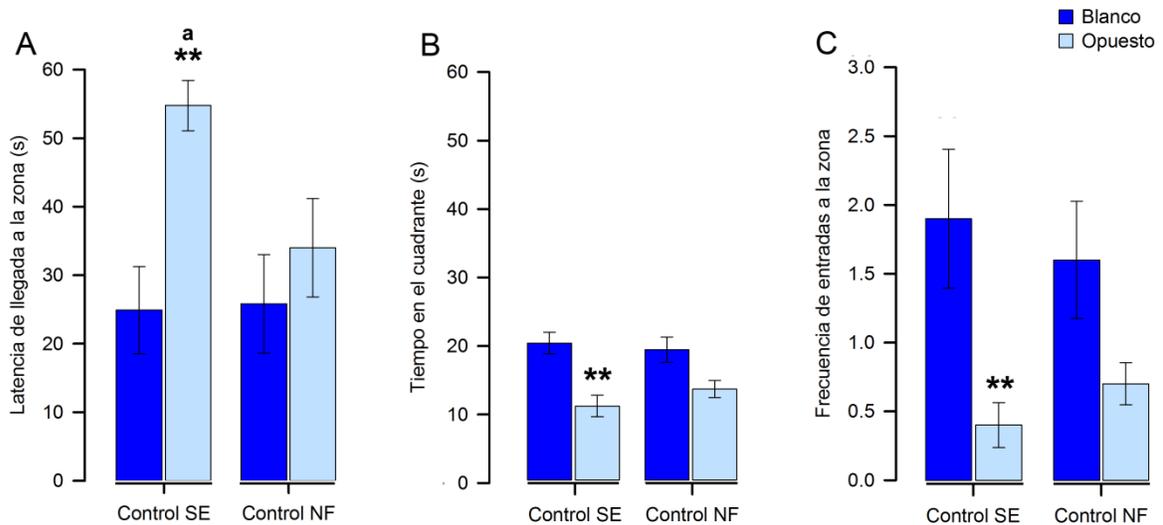


Figura 18. Prueba de transferencia a las 24 horas de los grupos control SE y control con NF. A) Latencia de llegada a la zona. B) Tiempo de permanencia en el cuadrante. C) Frecuencia de entradas a la zona. Los ** indican la diferencia significativa entre la zona blanco y la zona opuesto del grupo SE, $**p < 0.01$. La letra a indica la diferencia entre la zona opuesto del grupo SE y la zona opuesto del grupo NF $a < 0.01$. Los datos se expresan como la media \pm error estándar de la media. El tamaño de los grupos fue de $n=10$ ratas.

En lo que respecta al análisis de la frecuencia de entrada a la zona blanco contra la frecuencia de entradas a la zona opuesta, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la zonas ($F_{1, 18} = 11.419$; $p < 0.01$). No obstante, los resultados no mostraron diferencias significativas en el factor tratamiento ($F_{1, 18} = 0.000$; $p > 0.05$). Asimismo, el análisis no mostró diferencias entre la interacción del tratamiento y la zona ($F_{1, 18} = 0.714$; $p > 0.05$).

La prueba post hoc LSD de Fisher arrojó diferencias estadísticamente significativas entre la zona blanco y opuesta del grupo control SE ($p < 0.01$), el cual muestra un mayor número de entradas a la zona blanco, sugiriendo que las ratas recuerdan la tarea. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre la zona blanco y la zona opuesta del grupo control NF (Figura 18 C).

5.2. Experimento 2

5.2.1. Sesión de entrenamiento

Se realizó el análisis de las latencias de escape de los ocho ensayos en la sesión de entrenamiento de los diferentes grupos sin estrés (SE) mediante un ANOVA de dos vías con medidas repetidas [Factor A= tratamientos (control SE, E-6801, E-6837, Ro 04-6790 y SB-271046); Factor B= ensayos (los 8 ensayos)]. Los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($F_{4, 294} = 1.165$; $p > 0.05$), debido a que el tratamiento de cada grupo fue administrado al finalizar la sesión de entrenamiento, es decir, ningún grupo estaba bajo la influencia de fármacos. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas al analizar las latencias de escape durante los ensayos ($F_{7, 294} = 46.836$, $p < 0.001$), lo que indica que los sujetos aprendieron la tarea ya que disminuyó la latencia de escape a la plataforma durante los ensayos. Por otra parte, el análisis no mostró diferencias significativas entre la interacción del tratamiento y los ensayos ($F_{28, 294} = 0.952$; $p > 0.05$).

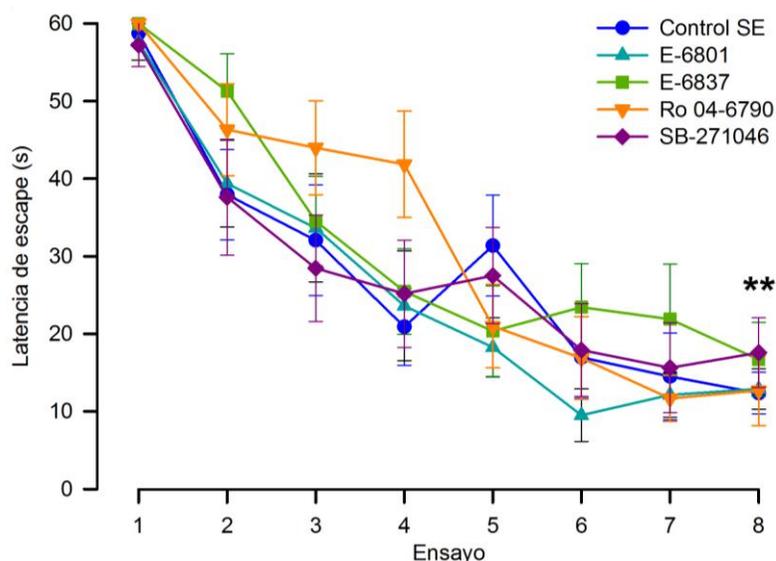


Figura 19. Curvas de adquisición de la tarea espacial del LAM de los grupos SE. Los datos se expresan como la media \pm error estándar de la media. Los ** indican que el ensayo 1 es estadísticamente diferente del ensayo 8 ** $p < 0.01$. El tamaño de los grupos fue de $n = 9$ ó 10 ratas.

Al realizar la prueba post hoc LSD de Fisher, se comparó el ensayo 1 contra el ensayo 8, mostrando diferencias significativas, sugiriendo que los sujetos de los grupos (control SE, E-6801, E-6837, SB-271046 y Ro 04-6790) aprendieron la tarea, ya que disminuyó la latencia de escape durante los ensayos ($p < 0.001$). Por otra parte, al analizar las latencias de escape del ensayo 8 entre los distintos grupos, utilizando la prueba post hoc LSD de Fisher, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$), lo que indica que los grupos tuvieron el mismo nivel de aprendizaje en el último ensayo (Figura 19).

5.2.2. Prueba de retención a las 24 horas

Con la finalidad de determinar el efecto de los fármacos agonistas y antagonistas del receptor 5-HT₆ en la consolidación de la memoria espacial, se analizó la diferencia de la latencia de llegada a la plataforma virtual (lugar donde se encontraba previamente la plataforma), el tiempo de permanencia y la frecuencia de entradas a la zona blanco en la prueba de retención de los distintos grupos que recibieron tratamiento. Cada parámetro se analizó de manera independiente y se comparó contra la zona opuesta; si la rata recuerda la tarea tendrá menor latencia de llegada a la zona blanco así como mayor tiempo de permanencia y número de entradas a la zona blanco. Para verificar esto, se realizó el análisis de estos parámetros utilizando la prueba de ANOVA de dos vías con medidas repetidas [Factor A= tratamientos (Control SE, E-6801, E-6837, Ro 04-6790 y SB-271046); Factor B= zonas (blanco vs. opuesto)].

El análisis de varianza del tiempo de llegada a la plataforma virtual, no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($F_{4, 42} = 1.296$; $p > 0.05$); sin embargo se encontraron diferencias en el factor de las zonas ($F_{1, 42} = 13.266$; $p < 0.01$). Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas en la interacción de los tratamientos y las zonas ($F_{4, 42} = 1.789$; $p > 0.05$).

La prueba post hoc LSD de Fisher arrojó diferencias significativas entre la zona blanco y la opuesta del grupo control SE ($p < 0.01$), así como entre las zonas del grupo que recibió el antagonista SB-271946 ($p < 0.05$) (Figura 20).

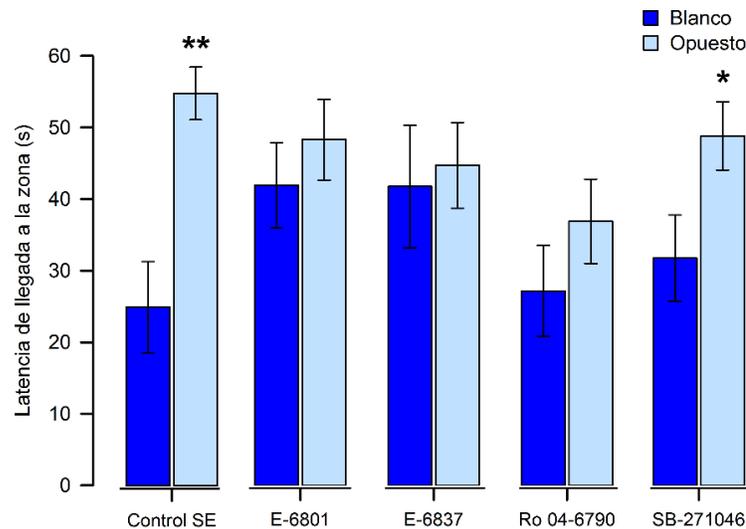


Figura 20. Latencia de llegada a la plataforma virtual en la prueba de retención de los grupos SE que recibieron tratamiento con los agonistas y antagonistas del receptor 5-HT₆. Los ** indican que la latencia de llegada a la zona blanco, es estadísticamente diferente de la latencia a la zona opuesta del grupo control SE ** $p < 0.01$. El * indica que la latencia a la zona blanco, es estadísticamente diferente de la latencia de llegada a la zona opuesta del grupo SB-271046 * $p < 0.05$. Los datos se expresan como la media \pm error estándar de la media. El tamaño de los grupos fue de $n = 9$ ó 10 ratas.

El análisis estadístico mediante un ANOVA de dos vías con medidas repetidas, del tiempo de permanencia en el cuadrante blanco contra el tiempo de permanencia en el cuadrante opuesto no mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($F_{4, 42} = 0.317$; $p > 0.05$), mientras que si las hubo en el factor de las zonas ($F_{1, 42} = 13.533$; $p < 0.01$). Sin embargo, no se encontraron diferencias en la interacción del tratamiento y la zona ($F_{4, 42} = 1.339$; $p > 0.05$).

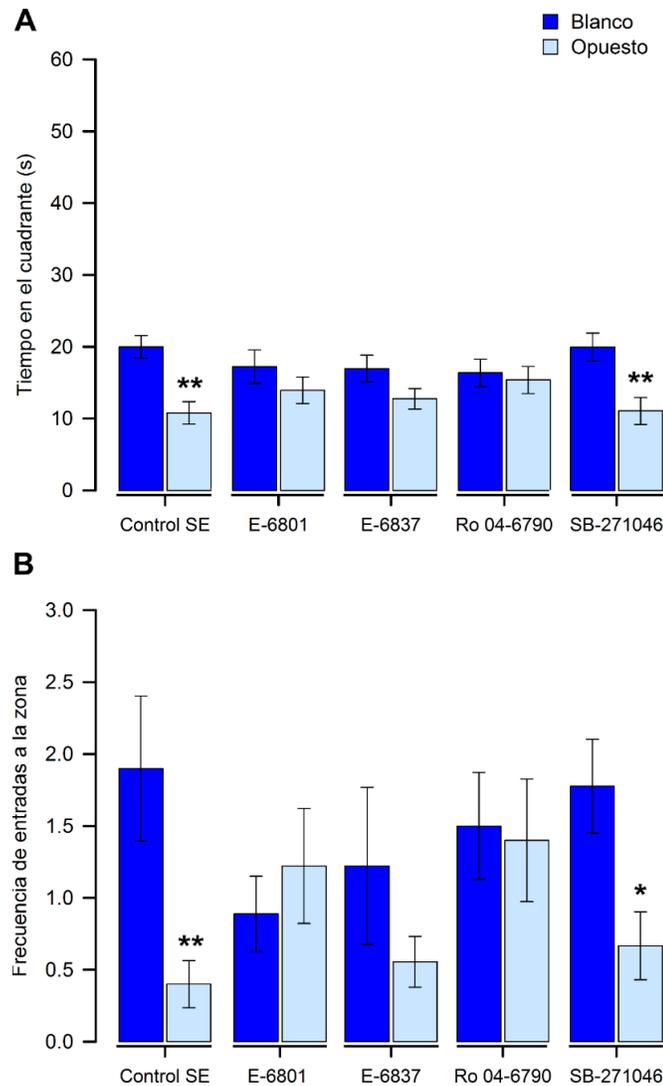


Figura 21. A) Tiempo de permanencia en el cuadrante blanco en la prueba de retención a las 24 h de los grupos SE y que recibieron tratamiento con los fármacos agonistas y antagonistas del receptor 5-HT₆. B) Frecuencia de entradas a la zona blanco en la prueba de retención. Los datos se expresan como la media \pm error estándar de la media. Los ** indican la diferencia entre la zona blanco y la opuesta de los grupos control SE y SB-27046 ** $p < 0.01$; * ** $p < 0.05$. El tamaño de los grupos fue de $n = 9$ ó 10 sujetos.

Al realizar la prueba post hoc LSD de Fisher, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el tiempo de permanencia en la zona blanco y el tiempo de permanencia en la zona opuesta de los grupos control SE ($p < 0.01$) y el grupo que recibió el antagonista SB-271046 ($p < 0.01$) (Figura 21 A).

Por otra parte, el análisis de la frecuencia de entradas a la zona blanco y a la zona opuesta durante la prueba de retención, utilizando un ANOVA de dos vías de medidas de medidas repetidos, no mostró diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento de los grupos SE ($F_{4, 42} = 0.690$; $p > 0.05$), mientras que las hubo en el factor de las zonas ($F_{1, 42} = 6.50$; $p < 0.01$). Asimismo no se encontraron diferencias en la interacción del tratamiento y la zona ($F_{4, 42} = 1.947$; $p > 0.05$).

La prueba post hoc LSD de Fisher arrojó diferencias estadísticamente significativas entre el número de entradas a la zona blanco y a la zona opuesta del grupo control SE ($p < 0.01$), así como del grupo que recibió el antagonista SB-271046 ($p < 0.05$) (Figura 21 B).

5.3. Experimento 3

5.3.1. Sesión de entrenamiento

Se analizaron las latencias de escape obtenidas durante los ocho ensayos de la sesión de entrenamiento de los distintos grupos que fueron sometidos a estrés agudo inducido por NF, mediante una prueba de ANOVA de dos vías de medidas repetidas [Factor A= tratamiento (control NF, E-6801, E-6837, Ro 04-6790 y SB-271046); Factor B= ensayo (los 8 ensayos)].

El análisis no mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($F_{4, 315} = 0.830$, $p > 0.05$), lo cual es el resultado esperado, ya que los tratamientos fueron administrados una vez finalizada la sesión de entrenamiento. Sin embargo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los ensayos ($F_{7, 315} = 50.790$, $p < 0.001$). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas entre la interacción de los tratamientos y los ensayos ($F_{28, 315} = 1.130$; $p > 0.05$).

Al realizar la prueba post hoc LSD de Fisher, se comparó la latencia de escape de todos los grupos sometidos a NF, en el ensayo 1 con la latencia del ensayo 8, encontrándose diferencias significativas ($p < 0.001$), sugiriendo que todos los grupos aprendieron la tarea al disminuir la latencia de escape durante los ensayos (Figura 22).

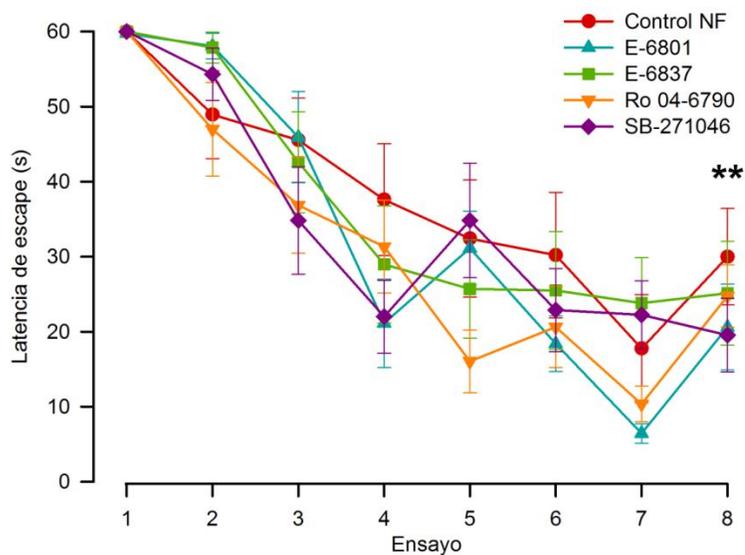


Figura 22. Curvas de adquisición de la tarea espacial del LAM de los grupos que fueron sometidos a nado forzado (NF). Los datos se expresan como la media \pm error estándar de la media. Los ** indican que el ensayo 1 es estadísticamente diferente del ensayo 8 ** $p < 0.001$. El tamaño de los grupos fue de $n = 10$ ratas.

Por otra parte, al realizar el análisis de las latencias de escape del ensayo 8 con la prueba LSD de Fisher, se encontró que no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los grupos, esto demuestra que tuvieron el mismo nivel de aprendizaje en el último ensayo.

5.3.2. Prueba de retención a las 24 horas

Con la finalidad de determinar el efecto de los fármacos agonistas y antagonistas del receptor 5-HT₆ en la consolidación de la memoria espacial de

ratas estresadas, se analizó la latencia de llegada a la plataforma virtual (lugar donde se encontraba previamente la plataforma), el tiempo de permanencia y la frecuencia de entradas a la zona blanco en la prueba de retención. Cada parámetro se analizó de manera independiente y se comparó contra la zona opuesta; si la rata recuerda la tarea tendrá menor latencia de llegada a la zona blanco así como mayor tiempo de permanencia y número de entradas a la zona blanco.

Se analizaron de las latencias de llegada a la plataforma virtual (lugar donde se encontraba previamente la plataforma) de los distintos grupos (control NF, E-6801, E-6837, SB-271046 y Ro 04-6790) utilizando el análisis de varianzas de Kruskal-Wallis, esto debido a que los datos no cumplen homogeneidad de varianzas. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la latencia de llegada a la zona blanco ($H_4 = 10.711$; $p < 0.05$) entre los tratamientos. Al realizar las comparaciones entre pares de grupos, empleando la prueba U de Mann-Whitney, se encontraron diferencias significativas entre el grupo control NF y el grupo que recibió el agonista E-6801 ($p < 0.05$), cuya latencia de llegada a la plataforma virtual fue mayor, es decir, tarda más tiempo en llegar a la plataforma.

Sin embargo, al analizar las latencias de llegada a la zona opuesto de los grupos mediante una prueba de Kruskal-Wallis, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($H_4 = 3.093$; $p > 0.05$).

Al realizar la prueba de Wilcoxon, para evaluar la latencia de llegada a la zona blanco contra la latencia de llegada a la zona opuesta de cada grupo, se encontraron únicamente diferencias significativas entre las zonas del grupo que recibió el agonista E-6801 ($p < 0.05$), sin embargo como se mencionó anteriormente, presenta una latencia de llegada mayor a la zona blanco. El resto de los grupos no presenta diferencias significativas entre la zona blanco y la opuesta, lo que sugiere que no recuerdan la tarea (Figura 23).

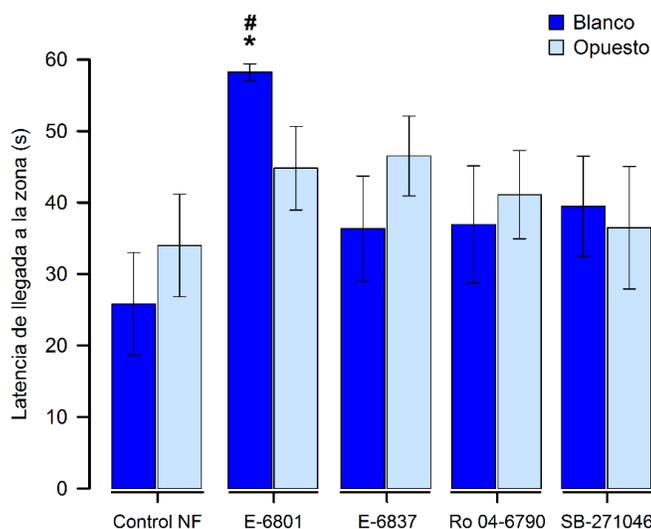


Figura 23. Latencia de llegada a la zona blanco en la prueba de retención a las 24 h de los grupos que fueron sometidos a NF y recibieron tratamiento con los agonistas y antagonistas del receptor 5-HT₆. El * indica que el grupo E-6801 es estadísticamente diferente de los demás grupos en la zona blanco * $p < 0.05$. El # indica la diferencia entre la zona blanco y la opuesta del grupo E-6801 # $p < 0.05$. Los datos se expresan como la media \pm error estándar de la media. El tamaño de los grupos fue de $n = 10$ ratas.

Asimismo el análisis del tiempo de permanencia en el cuadrante blanco durante la prueba de retención se realizó mediante una prueba de Kruskal-Wallis, debido a la desigualdad de varianzas, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($H_4 = 5.474$; $p > 0.05$). Posteriormente, se realizó la prueba de Wilcoxon con el fin de evaluar el tiempo de permanencia en la zona blanco contra el tiempo en la zona opuesto de cada grupo, lo que mostró diferencias estadísticamente significativas en el grupo que recibió el antagonista SB-271046 ($p < 0.05$) (Figura 24 A).

Por otra parte, se realizó el análisis de la frecuencia de entradas a la zona blanco y a la zona opuesto mediante un ANOVA de dos vías con medidas repetidas [Factor A= tratamientos (Control NF, E-6801, E-6837, Ro 04-6790 y SB-271046); Factor B= zonas (blanco vs. opuesto)]. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($F_{4, 45} = 2.207$, $p > 0.05$). Sin embargo, el análisis mostró diferencias significativas entre la zonas ($F_{1, 45} = 5.977$; p

< 0.05), mientras que no las hubo en la interacción del tratamiento y las zonas ($F_{4,45} = 1.483$, $p > 0.05$).

La prueba post hoc LSD de Fisher arrojó diferencias significativas entre el número de entradas a la zona blanco del grupo control NF y el grupo E-6801 ($p < 0.05$). De igual forma el grupo E-6801 mostró diferencias significativas con el grupo E-6837 ($p < 0.05$) y el Ro 04-6790 ($p < 0.05$), en la zona blanco (Figura 24 B).

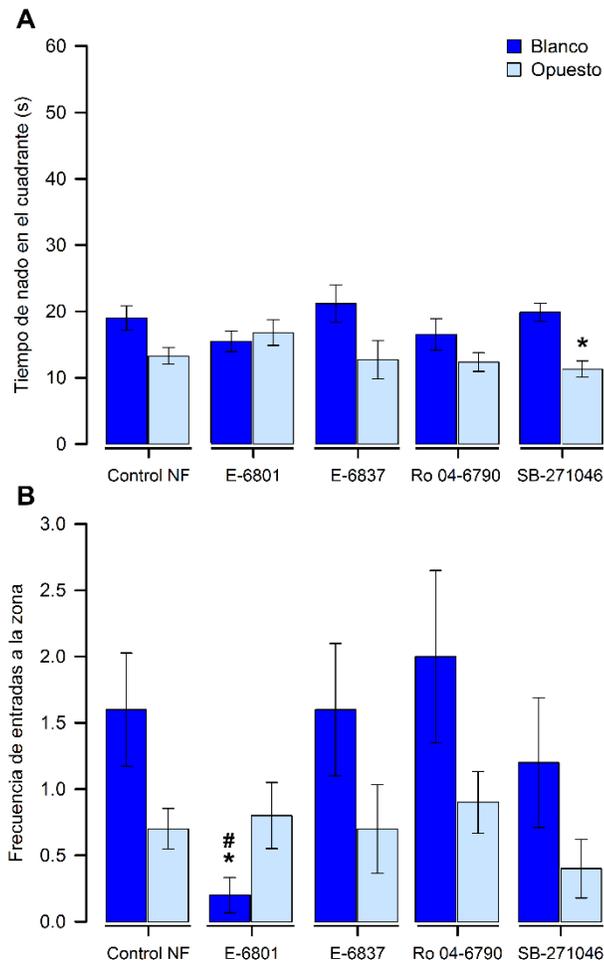


Figura 24. A) Tiempo de permanencia en el cuadrante blanco en la prueba de retención de los grupos sometidos a nado forzado (NF), que recibieron tratamiento con los agonistas y antagonistas del receptor 5-HT₆. El * indican la diferencia significativa del grupo E-6801 con los grupos control NF, E-6837 y Ro 04-6790 * $p < 0.01$. B) Frecuencia de entradas a la zona blanco. Los datos se expresan como la media \pm error estándar de la media. El tamaño de los grupos fue de 10 sujetos.

6. DISCUSIÓN

Los hallazgos del primer experimento apoyan la propuesta de muchos grupos de investigadores que afirman que los glucocorticoides participan en el aprendizaje y la memoria (Roosendal, 2002; Sandi, 2003). El primer experimento consistió en determinar la influencia del estrés agudo inducido por NF sobre los procesos de aprendizaje y memoria en una tarea espacial del LAM con plataforma oculta. Los resultados mostraron diferencias significativas entre los grupos control SE y control NF durante la sesión de entrenamiento, indicando que los sujetos del grupo control NF tardan más en aprender la tarea del LAM. Con respecto a la retención, el grupo control NF presentó deterioro, ya que no mostró diferencias estadísticamente significativas entre la latencia de llegada, el número de entradas y el tiempo de nado en la zona blanco y en la opuesta del LAM. Una explicación de estos resultados es el hecho de que el estrés se aplicó 24 h antes del entrenamiento de los animales, lo cual se ve apoyado con la hipótesis propuesta por Jöels y col. (2006), en la que se argumenta que el estrés solo facilita el aprendizaje cuando es experimentado durante o muy cercano a la experiencia. De esta manera, las hormonas y neurotransmisores liberados en respuesta al estrés ejercen sus acciones en las mismas estructuras que son activadas por la situación que es aprendida.

Existen reportes que indican que el estrés agudo previo al entrenamiento deteriora los procesos de adquisición y retención de la tarea espacial de LAM, estos efectos se han relacionado con la facilitación de LTD en el hipocampo (Xiong y col., 2003). Otro ejemplo, es el trabajo de Diamond y col. (2006), quienes realizaron un estudio en el que encontraron deterioro en la MLP en ratas que fueron expuestas durante 30 min al depredador antes del aprendizaje.

Se ha reportado que el pico más alto de CORT es observado a los 10 min durante el NF y que los niveles basales de CORT son alcanzados después de 2 h

de haber comenzado el NF (Báez y Volosin, 1993). Resultados preliminares de nuestro laboratorio indican que los niveles de CORT durante la tarea de LAM, así como en el modelo de NF no muestran diferencias significativas. Lo que nos indica que el estrés inducido por NF al que son sometidas las ratas, no difiere del que experimentan durante el entrenamiento en el LAM.

En el experimento 2 del presente trabajo, se administró a grupos independientes de ratas SE los agonistas y los antagonistas del receptor 5-HT₆, con la finalidad de evaluar el efecto de estos fármacos en la consolidación de una tarea espacial. Los resultados obtenidos mostraron que los agonistas E-6801 y E-6837 y el antagonista Ro 04-6790, producen deterioro sobre la consolidación de la memoria espacial de las ratas SE. No obstante, las dosis utilizadas en el presente trabajo han sido reportadas como las óptimas para producir efectos facilitadores en otras tareas (Marcos y col., 2008; Briones-Aranda y col., 2010; Kendall y col., 2011, Woods y col., 2012).

Sin embargo, existen grupos de investigadores que no encontraron los efectos facilitadores de los antagonistas Ro 04-6790 y SB-271046 (Russell y Dias, 2002; Lindner y col., 2003). Al parecer, las discrepancias en los resultados dependen crucialmente de la tarea utilizada, así como de la fase de la formación de la memoria en la que se administran los tratamientos (Woods y col., 2012).

Por el contrario, el antagonista SB-271046 no deterioró la consolidación de la memoria, lo que fue consistente en todos los parámetros evaluados. Sin embargo, no se observó un efecto facilitador de este fármaco. Lo anterior se podría explicar con base en el trabajo de Marcos y col. (2010), quienes encontraron disminución de los receptores 5-HT₆ en el hipocampo de ratas que han sido entrenadas en el LAM. Asimismo, reportaron un incremento en los niveles de CREB en ratas que fueron entrenadas en el LAM o aquellas que fueron tratadas con el antagonista SB-271046 sin entrenamiento. Sin embargo, dicho efecto no fue observado cuando se entrenaron y se administró el tratamiento del antagonista en el mismo grupo.

Debido a la relación que se ha reportado entre el receptor 5-HT₆ con el eje HPA, el principal objetivo de esta tesis fue elucidar el papel de este receptor en la consolidación de la memoria espacial en el LAM de ratas estresadas, a través de la administración sistémica de agonistas y antagonistas selectivos al receptor 5-HT₆. Dado el deterioro en la retención de la tarea espacial del LAM en el grupo control NF se planteó el tercer experimento, en el que se esperaba que el efecto del NF fuera bloqueado por los fármacos agonistas y antagonistas del receptor 5-HT₆.

Los resultados obtenidos en la prueba de retención de los sujetos sometidos a estrés mediante NF y que recibieron la administración sistémica de los fármacos, mostraron diferencias estadísticamente significativas en el tiempo de llegada a la plataforma virtual del grupo que fue tratado con el fármaco agonista E-6801, el cual presentó una latencia de llegada mayor, es decir tarda más en llegar a la plataforma virtual. Asimismo, dicho grupo mostró menor frecuencia de entradas a la zona blanca, lo que sugiere que este agonista produce deterioro en la consolidación de la información de ratas que fueron sometidas a NF.

En estudios previos, se reportó que el agonista E-6801 tiene la capacidad de incrementar la activación de la enzima AC (Romero y col., 2006). Sin embargo, este efecto no se observó en animales entrenados en el LAM y tratados a su vez con este fármaco (Marcos y col, 2010). Lo que permite suponer que bajo dichas condiciones no se están activando las cascadas bioquímicas que se han visto implicadas en la formación de la MLP.

Se encontró que el antagonista SB-271046 bloquea el deterioro producido por el NF sobre la consolidación de la memoria espacial, sin embargo este resultado no fue consistente en todos los parámetros que se evaluaron en la prueba de retención. Lo anterior podría estar relacionado con el efecto antinociceptivo que se ha atribuido a este fármaco (Finn y col., 2007).

Los resultados obtenidos con los fármacos agonistas y antagonistas del receptor 5-HT₆ no concuerdan con hallazgos encontrados anteriormente en nuestro laboratorio, en los que la administración sistémica de fármacos agonistas y antagonistas del receptor 5-HT₆ bloquean el efecto del NF sobre la consolidación en la tarea de reconocimiento de objetos (Briones-Aranda y col., 2011).

7. CONCLUSIONES

El estrés agudo inducido por NF produce modificaciones en el proceso de adquisición y en la consolidación de la memoria, lo cual se refleja en el aumento significativo de las latencias de escape en el entrenamiento de la tarea espacial del LAM.

Los agonistas E-6801 y E-6837 del receptor 5-HT₆ producen deterioro sobre la consolidación de la memoria espacial en ratas SE.

El antagonista Ro 04-6790 del receptor 5-HT₆ produce deterioro sobre la consolidación de la memoria espacial en ratas SE.

El deterioro en la consolidación de la tarea de ratas sometidas a estrés agudo mediante NF, no fue bloqueado por la administración sistémica de los fármacos agonistas y antagonistas del receptor 5-HT₆.

El agonista E-6801 a una dosis de 5mg/kg produce deterioro en la consolidación de la memoria espacial de ratas estresadas mediante NF.

8. REFERENCIAS

- Abel T** y **Lattal KM**. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Current Opinion in Neurobiology* **2001**;11:180-187.
- Adams JP** y **Sweatt JD**. Molecular psychology: Roles for the ERK MAP kinase cascade in memory. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **2002**;42:135-163.
- Amaral DG**, **Scharfman HE** y **Lavenex P**. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Progress in Brain Research* **2007**;163:3-22.
- Azmitia EC**. Evolution of Serotonin: Sunlight to Suicide. En: **Müller CP** y **Jacobs BL**, Eds. *Handbook of behavioral neuroscience*. London: Academic Press, **2010**: 3-22.
- Báez M** y **Volosin M**. Corticosterone influences forced swim-induced immobility. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **1994**;3:729-736.
- Barnes CA**. Spatial learning and memory processes: the search for their neurobiological mechanisms in the rat. *Trends in Neurosciences* **1988**;11:163-169.
- Berumen LC**, **Rodríguez A**, **Miledi R** y **García-Alcocer MA**. Serotonin receptors in hippocampus. *The Scientific World Journal* **2012**:1-15.
- Briones-Aranda A**, **Rocha L** y **Picazo O**. Influence of forced swimming stress on 5-HT_{1A} receptors and serotonin levels in mouse brain. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* **2005**;29:275-281.
- Briones-Aranda A**, **Ossio R**, **Prado-Alcalá RA** y **Quirarte GL**. Influencia de dos fármacos serotoninérgicos 5-HT₆ en la respuesta al estrés y su implicación cognitiva. Instituto de Neurobiología UNAM Campus Juriquilla. XVII Jornadas Conmemorativas Septiembre 20 al 24, **2010**. Exposición de carteles.
- Briones-Aranda A**, **Ossio R**, **Quirarte GL** y **Prado-Alcalá RA**. Role of the 5-HT₆ receptor in the stress response and its cognitive implications. Congreso Internacional de Farmacología, México **2011**. Exposición de carteles.
- Cassel J-C**. Experimental studies on the role(s) of serotonin in learning and memory functions. En: **Müller CP** y **Jacobs BL**, Eds. *Handbook of behavioral neuroscience*. London: Elsevier, **2010**: 429-447.

Cazakoff BN, Johnson KJ y Howland JG. Converging effects of acute stress on spatial and recognition memory in rodents: a review of recent behavioural and pharmacological findings. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* **2010**;34:733-741.

Citri A y Malenka RA. Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology Reviews* **2008**;33:18-41.

Codony X, Vela JM y Ramirez MJ. 5-HT(6) receptor and cognition. *Current Opinion in Pharmacology* **2011**;11:94-100.

Collins JW. The neuroscience of learning. *Journal of Neuroscience Nursing* **2007**;39:305-310.

Cooper JR, Bloom FE y Roth RH. The biochemical basis of neuropharmacology. 6th ed. New York: Oxford University Press; **2003**.

Correa M. Neuroanatomía funcional de los aprendizajes implícitos: asociativos, motores y de hábito. *Revista de Neurología* **2007**;44:234-242.

Cruz-Morales SE. Sobre el estudio de la memoria. *Revista Mexicana de Análisis de la Conducta* **2006**;32:199-201.

Dawson LA, Nguyen HQ y Li P. In vivo effects of the 5-HT6 antagonist SB-271046 on striatal and frontal cortex extracellular concentrations of noradrenaline, dopamine, 5-HT, glutamate and aspartate. *British Journal of Pharmacology* **2000**;130: 23-26

de Kloet ER, Joels M y Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature Reviews Neuroscience* **2005**;6:463-475.

Descarries L, Riad M y Parent M. Ultraestructure of the Serotonin Innervation in the Mammalian Central Nervous System. En: Müller CP y Jacobs BL, Eds. *Handbook of behavioral neuroscience*. London: Academic Press, **2010**: 65-102

Diamond DM, Campbell AM, Park CR, Woodson JC, Conrad CD, Bachstetter AD y Mervis RF. Influence of Predator Stress on the Consolidation versus Retrieval of Long-Term Spatial Memory and Hippocampal Spinogenesis. *Hippocampus* **2006**; 16:571-576.

D'Souza UM y Craig IW. Genetic Organization of Serotonergic System. En: Müller CP y Jacobs BL, Eds. Handbook of behavioral neuroscience. London: Academic Press, **2010**: 23-50.

Dudai Y. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? Annual Review of Psychology **2004**;55:51-86.

Fone KCF. An update on the role of the 5-hydroxytryptamine₆ receptor in cognitive function. Neuropharmacology **2008**;55:1015-1022.

Gerard C, Martres MP, Lefevre K, Miquel MC, Verge D, Lanfumey L, Doucet E, Hamon M y el Mestikawy S. Immuno-localization of serotonin 5-HT₆ receptor-like material in the rat central nervous system. Brain Research **1997**;746:207-219.

Hilgard ER y Marquis DG. Conditioning and Learning. New York: Appleton-Century-Crofts; **1961**.

Hornung JP. The Neuroanatomy of the Serotonergic System. En: Müller CP y Jacobs BL, Eds. Handbook of behavioral neuroscience. London: Academic Press, **2010**:51-64

Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR y Humphrey PP. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). Pharmacological Reviews **1994**;46:157-203.

Howland JG y Wang YT. Synaptic plasticity in learning and memory: stress effects in hippocampus. Progress in brain research **2008**;169:145-158.

ILAR. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington, DC: National Academy Press; **1996**.

Joëls M, Pu ZW, Wiegert O, Oitzl MS y Krugers HJ. Learning under stress: How does it work? Trends in Cognitive Sciences **2006**;10:152-158.

Joëls M y Baram TZ. The neuro-symphony of stress. Nature Reviews Neuroscience **2009**;10:459-466.

Kandel ER. Mecanismos celulares del aprendizaje y de la memoria. En Kandel ER, Schwartz JH y Jessell TM, Eds. Neurociencia y conducta. 2nd ed. Madrid: Prentice Hall, **2002**:715-742.

Kandel ER, Kupfermann I y Iversen S. Learning and memory. En: Kandel ER, Schawartz JH y Jessell TM, Eds. Principles of neural science. 4th ed. New York: McGraw Hill, **2006**:1228-1247.

Kendall I, Slotten HA, Codony X, Burgueno J, Pauwels PJ, Vela JM y Fone KC. E-6801, a 5-HT₆ receptor agonist, improves recognition memory by combined modulation of cholinergic and glutamatergic neurotransmission in the rat. *Psychopharmacology* **2011**;213:413-430.

Kim JJ, Song EU y Kosten TA. Stress effects in the hippocampus: Synaptic plasticity and memory. *Stress* **2006**;9:1-11.

King MV, Marsden CA y Fone KC. A role for the 5-HT_{1A}), 5-HT₄ and 5-HT₆ receptors in learning and memory. *Trends in Pharmacological Sciences* **2008**;29:482-492.

Kohen R, Metcalf MA, Khan N, Druck T, Huebner K, Lachowicz JE, Meltzer HY, Sibley DR, Roth BL y Hamblin MW. Cloning, characterization, and chromosomal localization of a human 5-HT₆ serotonin receptor. *Journal of Neurochemistry* **1996**;66:47-56.

Kohen R, Fashingbauer LA, Heidmann DE, Guthrie CR y Hamblin MW. Cloning of the mouse 5-HT₆ serotonin receptor and mutagenesis studies of the third cytoplasmic loop. *Molecular Brain Research* **2001**;90:110-117.

Lindner MD, Hodges DB, Hogan JB, Orié AF, Corsa JA, Barten DM, Polson C, Robertson BJ, Guss VL, Gillman KW, Starrett JE y Gribkoff VK. An assessment of the effects of serotonin 6 (5-HT₆) receptor antagonists in rodent models of learning. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2003**;307:682-691.

Linthorst ACE y Reul JMHM. The impact of stress on serotonergic neurotransmission. En: Müller CP y Jacobs BL, Eds. Handbook of behavioral neuroscience. London: Elsevier, **2010**:475-491.

Lynch MA. Long-term potentiation and memory. *Physiological Reviews* **2004**;84:87-136.

Marcos B, Chuang TT, Gil-Bea FJ y Ramirez MJ. Effects of 5-HT₆ receptor antagonism and cholinesterase inhibition in models of cognitive impairment in the rat. *British Journal of Pharmacology* **2008**;155:434-440.

Marcos B, Aisa B y Ramírez MJ. Functional interaction between 5-HT₆ receptors and hypothalamic-pituitary-adrenal axis: cognitive implications. *Neuropharmacology* **2008**;54:708-714

Marcos B, Cabero M, Solas M, Aisa B y Ramirez MJ. Signalling pathways associated with 5-HT₆ receptors: relevance for cognitive effects. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* **2010**;13:775-784.

McGaugh JL y Roozendaal B. Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Current Opinion in Neurobiology* **2002**;12:205-210.

Meneses A. 5-HT system and cognition. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **1999**;23:1111-1125.

Meneses A. Effects of the 5-HT₆ receptor antagonist Ro 04-6790 on learning consolidation. *Behavioural Brain Research* **2001**;118:107-110.

Meneses A, Manuel-Apolinar L, Castillo C y Castillo E. Memory consolidation and amnesia modify 5-HT₆ receptors expression in rat brain: an autoradiographic study. *Behavioural Brain Research* **2007**;178:53-61.

Mengod G, Cortés R, Vilaró MT y Hoyer D. Distribution of 5-HT Receptors in the Central Nervous System. En: Müller CP y Jacobs BL, Eds. *Handbook of behavioral neuroscience*. London: Academic Press, **2010**: 123-138

Mitchell ES y Neumaier JF. 5-HT₆ receptors: a novel target for cognitive enhancement. *Pharmacology & Therapeutics* **2005**;108:320-333.

Mitchell ES, Sexton T y Neumaier JF. Increased Expression of 5-HT₆ Receptors in the Rat Dorsomedial Striatum Impairs Instrumental Learning. *Neuropsychopharmacology* **2007**;32:1520-1530.

Mohammad-Zadeh LF, Moses L y Gwaltney-Brant SM. Serotonin: a review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **2008**;31:187-199.

Monsma FJ, Jr., Shen Y, Ward RP, Hamblin MW y Sibley DR. Cloning and expression of a novel serotonin receptor with high affinity for tricyclic psychotropic drugs. *Molecular Pharmacology* **1993**;43:320-327.

Morgado I. Psicobiología del aprendizaje y la memoria: fundamentos y avances recientes. *Revista de Neurología* **2005**;40:289-297.

Morimoto M, Morita N, Ozawa H, Yokoyama K, Kawata M. Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain" an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Neuroscience Research* **1996**;26: 235-269.

Morris RG. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* **1984**;11:47-60.

Morris RG, Garrud P, Rawlins JN y O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* **1982**;297:681-683.

Nichols DE y Nichols CD. Serotonin receptors. *Chemical Reviews* **2008**;108:1614-1641.

O'Keefe J y Nadel L. The hippocampus as a cognitive map. Oxford: Clarendon Press; **1978**.

Oleskevich S y Descarries L. Quantified distribution of the serotonin innervation in adult rat hippocampus. *Neuroscience* **1990**;34:19-33.

Porsolt RD, Anton G, Blavet N y Jalfre M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *European Journal of Pharmacology* **1978**;47:379-391.

Prado-Alcalá RA, Solana-Figueroa R, Galindo LE, Medina AC y Quirarte GL. ¿Participa la serotonina cerebral en la memoria del aprendizaje incrementado? *Revista Mexicana de Análisis de la Conducta* **2003**;29:107.117.

Prado-Alcalá RA, Quiroz C, Garín ME, Díaz-Trujillo A, Díaz del Guante MA, Galindo LE, Martínez I y Quirarte G. Memoria: Consolidación y experiencia. En: Velázquez-Moctezuma J, ed. *Temas selectos de neurociencias III*. México: Universidad Autónoma Metropolitana; **2004**:121-138.

Prado-Alcalá RA y Quirarte GL. La consolidación de la memoria, un siglo después. *Revista de Neurología* **2007**;45:284-292.

Riemer C, Borroni E, Levet-Trafit B, Martin JR, Poli S, Porter RHP y Bös M. Influence of the 5-HT₆ Receptor on Acetylcholine Release in the Cortex: Pharmacological Characterization of 4-(2-Bromo-6-pyrrolidin-1-ylpyridine-4-sulfonyl)phenylamine, a Potent and Selective 5-HT₆ Receptor Antagonist. *Journal of Medicinal Chemistry* **2003**;46:1273-1276.

Rogers DC y Hagan JJ. 5-HT6 receptor antagonists enhance retention of a water maze task in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* **2001**;158:114-119.

Romero G, Sanchez E, Pujol M, Perez P, Codony X, Holenz J, Buschmann H y Pauwels PJ. Efficacy of selective 5-HT6 receptor ligands determined by monitoring 5-HT6 receptor-mediated cAMP signaling pathways. *British Journal of Pharmacology* **2006**;148:1133-1143.

Roosendaal B. Stress and memory: Opposing effects of glucocorticoids on memory consolidation and memory retrieval. *Neurobiology of Learning and Memory* **2002**;78:578-595.

Rueti E, Mustaca AE y Bentosela M. Memoria emocional: efectos de la corticosterona sobre los recuerdos. *Revista Latinoamericana de Psicología* **2008**;40:461-474.

Russell MG y Dias R. Memories are made of this (perhaps): A review of serotonin 5-HT(6) receptor ligands and their biological functions. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2002**;2:643-654.

Sandi C, Loscertales M y Guaza C. Experience-dependent facilitating effect of corticosterone on spatial memory formation in the water maze. *European Journal of Neuroscience* **1997**;9:637-642.

Sandi C, Venero C y Cordero M. Estrés, memoria y trastornos asociados. Implicaciones en el daño cerebral y el envejecimiento. España: Editorial Ariel; **2001**.

Sandi C. Implicación de los glucocorticoides en la consolidación de la memoria. *Revista de Neurología* **2003**;37:843-848.

Sandi C y Pinelo-Nava MT. Stress and memory: Behavioral effects and neurobiological mechanisms. *Neural Plasticity* **2007**;10:1-20.

Scoville WB y Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* **1957**;20:11-21.

Schwabe L, Wolf OT y Oitzl MS. Memory formation under stress: quantity and quality. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **2010**;34:584-591.

Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW y Kida S. CREB and memory. *Annual Review of Neuroscience* **1998**;21:127-48

Squire LR y **Kandel** ER. From short-term memory to long-term memory. Memory from mind to molecules. New York: Scientific American Library; **2000**:157-174.

Squire LR. Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory* **2004**;82:171-177.

Sweatt JD. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Current Opinion in Neurobiology* **2004**;14:311-317.

Tsien JZ. Learning and memory. En: Siegel GJ, Albers RW, Brady S y Price D, Eds. *Basic neurochemistry*. 7 ed. San Diego, California: Elsevier Academic Press, **2006**: 859-874.

Vicens P, Redolat R y Carrasco MC. Aprendizaje espacial y laberinto de agua: metodología y aplicaciones. *Psicothema* **2003**;15:539-544.

Wolf OT. HPA axis and memory. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* **2003**;17:287-299.

Woods S, Clarke NN, Layfield R y Fone KCF. 5-HT₆ receptor agonists and antagonists enhance learning and memory in a conditioned emotion response paradigm by modulation of cholinergic and glutamatergic mechanisms. *British Journal of Pharmacology* **2012**;167:436-449.

Woolley ML, Bentley JC, Sleight AJ, Marsden CA y Fone KC. A role for 5-HT₆ receptors in retention of spatial learning in the Morris water maze. *Neuropharmacology* **2001**;41:210-219.

Woolley ML, Marsden CA y Fone KC. 5-HT₆ receptors. *Current Drug Targets - CNS & Neurological Disorders* **2004**;3:59-79.

Xiong W, Yang Y, Cao J, Wei H, Liang C, Yang S, Xu L. The stress experience dependent long-term depression disassociated with stress effect on spatial memory task. *Neuroscience Research* **2003**;46:415-421

Yau JL, Noble J, Widdowson J y Seckl JR. Impact of adrenalectomy on 5-HT₆ and 5-HT₇ receptor gene expression in the rat hippocampus. *Molecular Brain Research* **1997**;45:182-186.

Yun HM, Kim S, Kim HJ, Kostenis E, Kim JI, Seong JY, Baik JH y Rhim H. The novel cellular mechanism of human 5-HT₆ receptor through an interaction with Fyn. *The Journal of Biological Chemistry* **2007**;282:5496-5505.