

PAPEL DE LOS RECEPTORES DE SEROTONINA 5-HT7 EN LA MODULACIÓN DE ACTIVIDAD NEURONAL

Sara Hidalgo Nieves

Trabajo de final de grado biotecnología

Tutora académica: Maria Teresa Blay Olivé, Biotecnología, departamento de bioquímica y biotecnología, mteresa.blay@urv.cat

En cooperación con: PuigLab, ICN2

Supervisora: M^a Victoria Puig Velasco, INC2, victoria.puig@icn2.cat

Convocatoria de Junio 2023

Jo, Sara Hidalgo Nieves, amb DNI 48066281F, sóc coneixedor de la guia de prevenció del plagi a la URV Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guía per a estudiants (aprovada el juliol 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquest TFG no constitueixen cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

Tarragona, 02 de Juny de 2023

(signatura)

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Sara', written over a horizontal line.

ÍNDICE

1. Resumen	3
1.1. Resumen	3
1.2. Palabras clave.....	3
1.3. Abreviaciones.....	3
2. Introducción	4
2.1. Esquizofrenia.....	4
2.1.1. Síntomas	4
2.1.2. Causas	4
2.1.3. Tratamientos actuales	5
2.1.4. Modelos animales	6
2.2. Sistema serotoninérgico.....	7
2.2.1. Serotonina	7
2.2.2. Producción de 5-HT	8
2.2.3. Receptores de serotonina	8
2.3. El receptor 5-HT ₇	9
2.3.1. AS19	11
2.3.2. SB269970	11
2.3.3. Lurasidona	12
2.4. Estudios previos del grupo de acogida	12
3. Objetivos	13
4. Metodología y plan de trabajo	14
4.1. Ratones.....	14
4.2. Cirugías.....	14
4.3. Inyecciones.....	15
4.4. Recogida de datos	16
4.5. Análisis de los datos	17
5. Resultados	21
5.1. Análisis MUA	21
6. Discusión	24
7. Conclusión	26
8. Agradecimientos	27
9. Autoevaluación	28
10. Bibliografía	29
11. Anexos	32

11.1.	ANEXO 1: TABLAS ESTADÍSTICAS PARA EL EXPERIMENTO 1	32
11.1.1.	HPC	32
11.1.2.	CPF	35
11.2.	ANEXO 2: TABLAS ESTADÍSTICAS PARA EL EXPERIMENTO 2	36
11.2.1.	HPC	36
11.2.2.	CPF	38
11.3.	ANEXO 3: TABLAS ESTADÍSTICAS PARA EL EXPERIMENTO 3	39
11.3.1.	HPC	39
11.3.2.	CPF	40

1. RESUMEN

1.1. RESUMEN

El receptor 5-HT₇ es uno de los receptores de serotonina sobre el cual actúan diversos de los tratamientos contra la esquizofrenia. Se conoce poco sobre como este receptor afecta a la actividad neuronal del sistema central. Por ello este trabajo se centra en la caracterización del receptor 5-HT₇R mediante electrofisiología con ayuda de la estimulación e inhibición selectivas de este a través del agonista AS19 y del antagonista SB269970. También se investigó el efecto del antipsicótico lurasidona sobre 5-HT₇R en ratones sanos. Así se observó que la activación de 5-HT₇R disminuye la media de descargas neuronales en el hipocampo y que no es capaz de revertir los efectos de la lurasidona probablemente debido al efecto sinérgico de este tratamiento con varios receptores además de 5-HT₇R.

1.2. PALABRAS CLAVE

Sistema nervioso central (CNS)

Serotonina (5-hydroxytryptamine, 5-HT)

Descarga neuronal

Potencial de acción

Antagonista

Agonista

1.3. ABREVIACIONES

CPF – córtex prefrontal

HPC – hipocampo

MUA – multi unit analysis

2. INTRODUCCIÓN

2.1. ESQUIZOFRENIA

La esquizofrenia es una enfermedad crónica heterogénea que afecta al sistema nervioso central y se encuentra asociada a impedimentos personales como cambios cognitivos, físicos y metabólicos. El desarrollo de esta es a largo plazo normalmente progresa a lo largo del tiempo y está asociada con una mortalidad temprana. (Cristiano et al., 2023; Winship et al., 2019)

2.1.1. SÍNTOMAS

Esta enfermedad tiene diferentes tipos de síntomas catalogados en tres clases diferentes: positivos, negativos y disfunción cognitiva (Owen et al., 2016). Entre los síntomas positivos encontramos delusiones, alucinaciones y trastornos del pensamiento, estos son también denominados síntomas psicóticos, debido a que cuando ocurren se pierde el contacto con la realidad. Los síntomas negativos más característicos incluyen anhedonia, abulia, retiro social y desorden del pensamiento y del habla. Por último, la disfunción cognitiva implica que los pacientes con esquizofrenia presentan disfunción de la memoria, del aprendizaje y de la atención, entre otros. La esquizofrenia también se asocia con otras enfermedades como alteraciones cardiovasculares, obesidad o diabetes; todas ellas consecuencia de estilos de vida poco sanos, manifestaciones de enfermedades mentales y efectos secundarios de ciertos medicamentos. (Cristiano et al., 2023; Owen et al., 2016; Winship et al., 2019).

2.1.2. CAUSAS

Estudios recientes han catalogado a esta enfermedad como una enfermedad genética, debido a que diferentes mutaciones en ciertos genes y diferentes proteínas truncadas tienen un grado de incidencia en esta enfermedad relevante (Liu et al., 2023). Otros estudios anteriores ya apuntaban que la genética tenía una contribución directa, pero no exclusiva, en esta enfermedad. Se ha observado en diversos estudios epidemiológicos que hay más de 100 loci que contienen diferentes alelos bastante comunes que pueden contribuir a un efecto en el desarrollo de esta enfermedad cuando se combinan (Owen et al., 2016). También existen factores ambientales que influyen en el riesgo de padecer esta enfermedad como por ejemplo estrés materno, deficiencias alimentarias

maternas u otras exposiciones que puedan impactar en el desarrollo temprano del cerebro (Owen et al., 2016).

Aunque, la causa de la esquizofrenia es todavía desconocida, y la mayor parte de investigación se centra en la dopamina y el glutamato, diferentes neurotransmisores y neuromoduladores como la serotonina o el ácido gamma-aminobutírico (GABA) también están implicado en su fisiopatología (Winship et al., 2019).

2.1.3. TRATAMIENTOS ACTUALES

Hay diversos medicamentos destinados a tratar la esquizofrenia, pero la respuesta de la mayor parte de ellos es inferior a la deseada debido a que su actividad es lenta y normalmente producen efectos secundarios (Winship et al., 2019). Los diferentes tratamientos para la esquizofrenia se pueden diferenciar en medicamentos antipsicóticos de primera generación o neurolépticos (la mayoría de los cuales son antagonistas del receptor de dopamina o serotonina), antipsicóticos de segunda generación y antipsicóticos de tercera generación (Maric et al., 2016). La mayoría de neurolépticos se unen al receptor D2R, como la clorpromazina o el haloperidol. Los neurolépticos son capaces de reducir los síntomas positivos de la esquizofrenia pero su efectividad contra los síntomas negativos es menor y un 30% de los pacientes no responden a estos tratamientos. Además, estos tratamientos tienen muchos efectos secundarios en los pacientes que los toman y pueden perder su efecto a lo largo del tiempo. Los antipsicóticos de segunda generación intentan evitar estos efectos secundarios aunque solo una pequeña parte de ellos tienen una mayor eficacia, algunos ejemplos son la clozapina, la lurasidona y la risperidona. Estos medicamentos a parte de actuar en D2R también actúan en varios de los receptores de serotonina (5-HT_{1A}R y 5-HT_{2A}R). Los antipsicóticos de tercera generación son ligandos funcionalmente selectivos o agonistas parciales de D2R con posibles acciones en 5-HT_{1A}R y 5-HT_{2A}R. La diferencia que tienen estos medicamentos con los de primera y segunda generación es que estos no son antagonistas sino agonistas parciales de D2R. Algunos ejemplos de antipsicóticos de tercera generación son aripiprazona o brexpiprazona (Maric et al., 2016; Stępnicki et al., 2018).

Entre los medicamentos usados actualmente se encuentra la clozapina, que es el medicamento más potente en efecto y tiene su acción en el D2R y

neurotransmisores como 5-HT_{2A}. No obstante, este es un medicamento que únicamente se prescribe si el resto han sido descartados, ya sea porque no tienen efecto en el paciente o por interacción con otra medicación (Owen et al., 2016).

Entre los nuevos medicamentos o adyuvantes a la terapia se encuentran también diferentes cambios en el estilo de vida. Un estudio reciente sugiere que la intervención en la actividad física hace que la calidad de vida de las personas que sufren esta enfermedad mejore (Cristiano et al., 2023). Otros estudios proponen el uso de probióticos psicobióticos como adyuvantes en el tratamiento de diferentes desordenes psiquiátricos, entre ellos la esquizofrenia (Vasiliu, 2023).

2.1.4. MODELOS ANIMALES

Hay diferentes modelos animales para el estudio de la esquizofrenia. Al buscar un buen modelo animal de esta enfermedad hay que tener en cuenta que entre sus síntomas se encuentran la delusiones paranoicas y afectación del lenguaje, algo que es característico en humanos, lo que hace que el paralelismo de estos modelos con los humanos sea algo complicado (Winship et al., 2019).

En ratones, hay diferentes modelos usados para diferentes estudios. Se encuentran tanto modelos murinos genéticos como farmacológicos. Los modelos genéticos más comunes incluyen la mutación del gen DIS1 (*disrupted in schizophrenia 1*). La reducción en la activación del receptor de glutamato NMDA es también un modelo establecido y ampliamente utilizado, debido a que se ha demostrado que en esquizofrenia hay un déficit en la neurotransmisión excitatoria mediada por glutamato a través de los receptores de glutamato NDMA (NDMA-R) (Castañé et al., 2015; Winship et al., 2019). Por ello se ha potenciado el uso de diferentes antagonistas de este receptor, como pueden ser la ketamina o la fenciclidina (PCP, polvo de ángel), como inductores químicos de la esquizofrenia (Winship et al., 2019). En humanos, la administración de PCP induce alucinaciones y delusiones, disminución de la capacidad de habla e impedimento de la actuación cognitiva. En ratones, este mismo compuesto produce hiperlocomoción y estereotipias (síntomas que se traducen en síntomas positivos en humanos), retiro social, daño en la inhibición de prepulsos (un sonido débil es escuchado antes del sonido del pulso en las grabaciones

neuronales, lo que inhibe la respuesta al segundo estímulo) y déficits cognitivos (Winship et al., 2019). A día de hoy la mayoría de los estudios de esquizofrenia en animales se llevan a cabo con la administración de PCP, que se puede realizar en diferentes regímenes: agudo, crónico y subcrónico dependiendo de las dosis que se le administren al animal (Lee & Zhou, 2019). El tratamiento crónico/subcrónico con PCP ha demostrado presentar un incremento de actividad locomotora y sensibilización del comportamiento en ratones C57BL/6J y C57BL/6N (Castañé et al., 2015).

2.2. SISTEMA SEROTONINÉRGICO

2.2.1. SEROTONINA

Se denomina sistema serotoninérgico al conjunto de serotonina (5-HT) y sus receptores y todas las posibles rutas de señalización en las que estén implicados (Maisonial-Besset et al., 2022). El Sistema serotoninérgico tiene un papel importante en la regulación central de muchas funciones autonómicas como la presión arterial, la actividad motora, la nocicepción y el comportamiento afectivo. En ratones, todos los grupos de serotonina en el rombencéfalo caudal, pero no los que se encuentran en el rombencéfalo rostral, proyectan al cordón espinal (Sengul & Watson, 2012). El córtex prefrontal (CPF) y el hipocampo (HPC) son las dianas más frecuentes para las neuronas 5-HTérgicas (Štrac et al., 2016). Tanto el CPF como el HPC son esenciales para la modulación de múltiples procesos conductuales y cognitivos y las interacciones entre ambas contribuyen al comportamiento y se ven alteradas en los desórdenes psiquiátricos. Estas zonas se encuentran altamente inervadas por aferentes serotoninérgicos que se originan en el núcleo rafe del mesencéfalo (Gener et al., 2019; Puig y Gener, 2015).

Diferentes estudios realizados sobre este sistema han demostrado que está involucrado en muchas funciones cerebrales, lo que se correlaciona con el gran número de enfermedades en las que se encuentra alterado, como Alzheimer, Parkinson, depresión o esquizofrenia (Maisonial-Besset et al., 2022).

La serotonina (5-hydroxytryptamine, 5-HT) es una monoamina que actúa como neurotransmisor en el sistema nervioso central (SNC), también es una hormona en el tracto gastrointestinal, un factor mitógeno y puede regular la

vasoconstricción (Sarrouilhe et al., 2021). Entre sus funciones, a parte de las ya mencionadas, se encuentran la temperatura corporal, el sueño, el apetito, el dolor y la actividad motora. Además de regular otras funciones como la cognición y el comportamiento emocional. Aunque su función más importante es el control de la cognición y las funciones ejecutivas. En varios estudios se ha demostrado que niveles disminuidos de serotonina tienen un efecto negativo en la flexibilidad de la conducta, que se describe como la habilidad de adaptarse a patrones de comportamiento cuando hay un cambio en el entorno. Por este motivo, el córtex prefrontal y el hipocampo son las dianas más frecuentes para las neuronas 5-HTérgicas (Alvarez et al., 2021; Štrac et al., 2016).

2.2.2. PRODUCCIÓN DE 5-HT

La producción de serotonina se realiza por una vía que incluye el triptófano, la triptófano hidroxilasa (TPH1/TPH2) y la 5-hidroxytriptófano (5-HTP) decarboxilasa. La serotonina se acumula en las vesículas presinápticas de las neuronas del SNC gracias al transportador vesicular de monoaminas (VMAT) y es secretada durante la señalización neuronal. Una vez esta señalización se ha llevado a cabo, la serotonina se elimina del espacio sináptico mediante el transportador selectivo de serotonina (SERT) y se recicla de vuelta a vesículas presinápticas o es metabolizada a ácido 5-hydroxyindole-3-acético (5-HIAA) por la monoamina oxidasa-A (MAO-A) en el citosol (Sarrouilhe et al., 2021). La serotonina tiene la función de dirigir el desarrollo cerebral en la embriogénesis. Pero en humanos y en ratones en el desarrollo más temprano la placenta es la fuente de serotonina para el desarrollo del cerebro. (Sarrouilhe et al., 2021)

2.2.3. RECEPTORES DE SEROTONINA

Existen 14 receptores de serotonina (5-HTR) reconocidos hasta el momento, los cuales se encuentran divididos en 7 familias divididos respecto a su distribución, estructura molecular, respuesta celular y función (Štrac et al., 2016). Las 7 familias de receptores son de 5-HT1R a 5-HT7R, todos ellos receptores anclados a proteína G, excepto la familia de 5-HT3 que son canales de iones activados por ligando, y todos ellos con potencial excitatorio, excepto 5-HT1R y 5-HT5R. La familia de 5-HT1R engloba a 5 subtipos de receptores, clasificados de A-F, la familia de 5-HT2R engloba 3 subtipos de A-C, la familia 5-HT3R engloba dos subtipos A y B, la familia 5-HT4 engloba 7 subtipos A-H y el resto solo tienen un

subtipo. Estos receptores se encuentran distribuidos por el SNC y diversos órganos, aunque las dianas más comunes para las neuronas serotoninérgicas son el CPF y el HPC. La activación de los diferentes 5-HTR pueden tener efectos muy distintos. Los agonistas y antagonistas de estos receptores pueden afectar a procesos cognitivos, lo que ha despertado el interés por estos receptores como tratamientos para déficits cognitivos (Pytliak et al., 2011; Štrac et al., 2016).

2.3. EL RECEPTOR 5-HT₇

El receptor 5-HT₇R (5-hydroxytryptamina 7, 5-HT₇R) es un receptor de serotonina que ha sido recientemente descubierto y que puede tener diferentes formas dependiendo de la isoforma poseída por el organismo. La expresión de este receptor está ampliamente extendida en todo el CNS, tracto digestivo y otros órganos. En concreto, en el sistema nervioso central se ha encontrado en una mayor densidad en neuronas del tálamo, giro dentado, septo, hipotálamo, sustancia negra, hipocampo, córtex y amígdala (Alvarez et al., 2021; Nikiforuk, 2015; Quintero-Villegas & Valdés-Ferrer, 2022). En el HPC se encuentra expresado en las células piramidales de la región *cornu ammonis* (CA)1 y CA3, tanto en las neuronas como en la glía (Quintero-Villegas & Valdés-Ferrer, 2019). En el CPF también se expresa en las neuronas piramidales entre la segunda y tercera semana del periodo postnatal (Higa et al., 2022). Se ha demostrado que este receptor se encuentra implicado en la termorregulación, los ritmos circadianos, el control de los ciclos de sueño y actividad, la nocicepción, la cognición y la motilidad intestinal (Alvarez et al., 2021; Quintero-Villegas & Valdés-Ferrer, 2022).

EL 5-HT₇R pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a la proteína G (GPCR) y se une a la adenilato ciclasa a través de proteínas G α estimulables. Su activación concluye en un incremento de adenosín monofosfato cíclico (cAMP) en el interior celular. Recientemente también se ha demostrado que este receptor puede interactuar con proteínas G α 12. La interacción con estas últimas en el hipocampo es la que se cree que puede estar relacionada con la regulación del desarrollo y que incrementa durante los estados postnatales. Esto implica que la serotonina también modula específicamente la formación de las primeras conexiones neuronales (Nikiforuk, 2015).

El gen que codifica por el receptor 5-HT₇R se localiza en el cromosoma 10, y contiene 3 intrones en la región codificante. Este receptor se expresa en 3 isoformas diferentes 5-HT₇R(A), 5-HT₇R(B) and 5-HT₇R(D) en humanos y 5-HT₇R(A), 5-HT₇R(B) and 5-HT₇R(C) en ratas, aunque no hay cambios de función aparentes entre las diferentes isoformas. Este receptor presenta una elevada homología entre especies, pero se ha visto que esta no es igual de elevada cuando se comprara con otros receptores de 5-HT (Quintero-Villegas & Valdés-Ferrer, 2022).

Se conoce poco sobre este receptor, pero se han observado efectos pro-cognitivos con el uso de antagonistas del 5-HT₇R (figura 1). Por ejemplo, el antagonista SB-269970 atenúa PCP y los déficits de aprendizaje inducidos por la escopolamina (un fármaco que es capaz de inducir desordenes cognitivos y actúa en los receptores muscarínicos (Chen & Yeong, 2020)) y también mejora la memoria de referencia. La lurasidona (otro antagonista), atenúa MK-801, escopolamina e impedimentos en el aprendizaje y la memoria inducidos por PCP (Štrac et al., 2016).

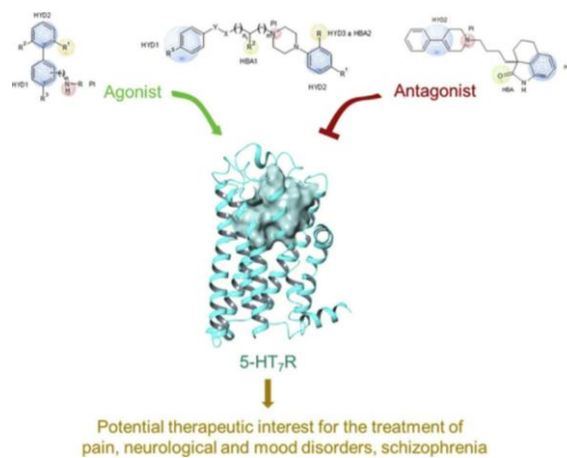


FIGURA 1: REPRESENTACIÓN DE LA ACCIÓN DE LOS TRATAMIENTOS DE 5-HT₇R. DE IZQUIERDA A DERECHA: ARILALQUILAMINA, ARILPIPERAZINA DE CADENA LARGA Y TETRAHIDROBENZINDOLE. EXTRAÍDO DEL TRABAJO DE THIRUMARAN ET AL., 2019.

En pacientes con esquizofrenia existe una disminución del número de estos receptores en el hipocampo y en el córtex prefrontal, también hay una elevada afinidad entre los antipsicóticos atípicos y este receptor y una asociación positiva entre el haplotipo del gen del 5-HT₇R y la incidencia de esquizofrenia. Esto

apunta a que este receptor se ve envuelto en las alteraciones neurobiológicas de la esquizofrenia. (Štrac et al., 2016)

5-HT7R se expresa predominantemente en las regiones límbicas, lo que apoya la hipótesis de que este contribuye en la regulación del procesamiento de la memoria, la cognición y la percepción emocional, asociándose también con algunos tipos de dominios cognitivos. (Okubo et al., 2021)

Se ha postulado que el antagonismo de 5-HT7R probablemente juegue un papel clave en la eficacia clínica de antipsicóticos como el aripiprazol, clozapina, quetiapina, risperidona y zotepina, que son antagonistas de 5-HT7R. Pero el funcionamiento sigue siendo desconocido, ya que las afinidades de estos fármacos son mayores en otros receptores de 5-HT. También se ha demostrado que los antagonistas de 5-HT7R son diferentes de los antipsicóticos atípicos, y por este motivo, las variantes de 5-HT7R no se encuentran asociadas con la respuesta a los antipsicóticos atípicos para la esquizofrenia (Okubo et al., 2021).

2.3.1. AS19

(2S)-(+)-8-(1,3,5-trimethylpyrazolin-4-yl)-2-(dimethylamino)tetralina o AS19 es una molécula agonista selectiva del receptor 5-HT7R. Esto quiere decir que se puede unir en el centro activo del receptor y ejercer el mismo efecto que la serotonina con la diferencia de que la activación del receptor por parte del agonista ejerce un mayor efecto en la cascada de señalización posterior, lo cual implica un aumento en el efecto de activación de este. AS19 es un compuesto que puede cruzar la barrera hematoencefálica muy fácilmente y afecta mayoritariamente a la descarga de las neuronas del núcleo rafe, aunque también se ha descubierto que tiene afinidad por otros receptores (Meneses et al., 2008; Nikiforuk, 2015; Roberts & Hedlund, 2012).

2.3.2. SB269970

SB269970 es una molécula que tiene propiedades antagonistas del receptor 5-HT7R. En concreto esta molécula bloquea la estimulación de la adenilato ciclasa mediante 5-HT. Esta molécula se une al centro activo del receptor 5-HT7R, bloqueándolo y haciendo que la serotonina no se pueda unir, aunque se ha demostrado que también tiene afinidad por otros receptores (Hagan et al., 2000; Roberts & Hedlund, 2012). SB269970 se ha demostrado que bloquea la

hiperactividad provocada por PCP, anfetamina y ketamina en ratas, que, como se ha mencionado anteriormente es un síntoma positivo de esquizofrenia en estos animales (Nikiforuk, 2015).

2.3.3. LURASIDONA

La lurasidona es un tratamiento aprobado por la FDA (United States Food and Drug Administration), la PMDA (Japanese Pharmaceuticals and Medical devices) y la EMA (European Medicines Agency) para la esquizofrenia. Diferentes estudios indican que la lurasidona mejora de forma significativa los síntomas positivos, negativos y depresivos y mejora la calidad de vida. Aunque aún no se sabe exactamente lo que la hace superior al resto de los medicamentos atípicos antipsicóticos (Okubo et al., 2021).

Se ha determinado que la lurasidona tiene un potente efecto antagonista en el receptor 5-HT_{2A}R y D₂R y parcialmente antagonista en 5-HT_{1A}R. Aunque su mayor efecto lo tiene como antagonista 5-HT₇R, y comparado con otros antipsicóticos es el que tiene mayor afinidad por este receptor. Las propiedades antipsicóticas de la lurasidona vienen dadas por su actuación con los receptores D₂R y 5-HT_{2A}, en cambio, sus propiedades antidepresivas están relacionadas con su unión a los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇ (Azhar & Shaban, 2022; Okubo et al., 2021). Se ha observado que dosis bajas de lurasidona tienen un mayor efecto en D₂R o 5-HT₇R. Con lo cual la lurasidona en las dosis aprobadas actualmente se puede considerar un antagonista de 5-HT₇R (Okubo et al., 2021). Estudios anteriores han demostrado que el tratamiento conjunto de lurasidona y AS19 revierte los efectos positivos de la lurasidona en ratas (Nikiforuk, 2015).

2.4. ESTUDIOS PREVIOS DEL GRUPO DE ACOGIDA

Estudios previos del grupo han descrito con detalle cómo distintos receptores de serotonina afectan a la actividad neuronal de circuitos que incluyen el córtex prefrontal y el hipocampo en ratones despiertos y en libre movimiento. Dichos estudios combinaron técnicas sofisticadas de electrofisiología y neurofarmacología. En concreto, anteriores trabajos del grupo han demostrado que los receptores 5-HT_{2A}R y 5-HT_{1A}R se expresan en abundancia en CPF y HPC y que ambos influyen la actividad neuronal de estas áreas de forma muy potente. Se ha demostrado que la activación farmacológica de 5-HT_{1A}R

disminuye la descarga de neuronas y las oscilaciones gamma en el CPF de ratones despiertos, mientras que la activación de 5-HT_{2A}R tiene el efecto contrario. En el HPC, el 5-HT_{1A}R es el encargado de la regulación de las oscilaciones theta reguladas por serotonina. También se ha observado que los receptores de dopamina D₂R disminuyen la descarga neuronal *in vivo* tanto en HPC como en CPF (Gener et al., 2019).

3. OBJETIVOS

No está esclarecido el patrón neuronal de las neuronas piramidales donde se expresa 5-HT₇R y no se sabe como afecta este receptor a la actividad neuronal. Por ello en relación a la información existente, se podría pensar que la activación de este receptor excitatorio puede llevar a cabo una activación neuronal tanto en HPC como en CPF.

Con respecto a la lurasidona, la afinidad de la este medicamento por diferentes receptores podría apuntar a un efecto conjunto de estos sobre la actividad neuronal en HPC y CPF, disminuyéndola. Pero el hecho de que tenga una mayor afinidad por el receptor 5-HT₇, siendo en este caso un potente antagonista del receptor lleva a pensar que tiene su efecto recae mayoritariamente sobre este receptor, con lo cual una activación de este podría afectar a la disminución de la actividad neuronal en HPC y CPF mediada por lurasidona.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la veracidad de las hipótesis planteadas realizando diferentes estudios. Primero, se pretendía describir cómo los receptores 5-HT₇R afectan a la actividad neuronal de la CPF y el HPC en ratones despiertos. Para ello, se registró la actividad neuronal en ratones a los que se les administró un agonista y un antagonista del receptor 5-HT₇R.

Por otro lado, también se pretendía estudiar si la administración de un agonista de 5-HT₇R era capaz de revertir los efectos de la lurasidona, dado que la lurasidona es un tratamiento que hace efecto en mas de un receptor, entre ellos 5-HT₇R.

4. METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO

4.1. RATONES

Para este experimento se utilizaron ratones macho C57BL/6J (n=5) de entre 2 y 3 meses de edad al inicio de los experimentos. Los ratones se mantuvieron en condiciones de control de temperatura ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$) e iluminación (ciclos de 12h de luz/oscuridad). Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo con la directiva de la unión europea 2010/63/EU y la legislación española (leyes 32/2007, 6/2013 and Real Decreto 53/2013) y fueron autorizados por el Comité de ética en experimentación animal del Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (PRBB) y la Generalitat de Catalunya.

4.2. CIRUGÍAS

Previamente a la llegada de la alumna, los ratones fueron inducidos con una mezcla de Ketamina y xilacina y posicionados en un aparato estereotáxico. La anestesia se mantuvo constante a 0.5-4% isoflurano. Seguidamente, se realizaron unas pequeñas craneotomías sobre el córtex prefrontal medial (mCPF) y el hipocampo dorsal (dHPC). A continuación, se atornillaron varios microtornillos en el cráneo para estabilizar el implante y el tornillo situado encima del cerebelo fue usado como tierra, tal y como se puede observar en la [figura 2](#). Se implantaron tres electrodos de tungsteno, un estereotodo (dos hilos entrelazados) y un tercer electrodo, en la región prelímbica del mCPF y dos más fueron implantados en el área CA1 del dHPC. Los electrodos fueron posicionados en el córtex prelímbico y en la región CA1. La actividad neuronal fue grabada mientras los electrodos se posicionaban en el cerebro para poder localizar la región CA1. Además de estos, tres electrodos de referencia fueron implantados en el cuerpo calloso y los ventrículos laterales. Los electrodos se hicieron con dos fibras de tungsteno trenzadas de $25\mu\text{m}$ de grosor y se unieron usando aislamiento térmico. Para la implantación los electrodos se implantaron de forma unilateral con cemento dental y las fibras de los electrodos se unieron a un adaptador para facilitar su conexión al sistema de grabación. Después de la cirugía, los ratones tuvieron al menos una semana de reposo para su correcta recuperación durante la cual fueron extensamente monitoreados y recibieron tratamientos de analgesia y antiinflamatorios. Además, los animales también

fueron familiarizados con el implante conectado al cable de grabación. Después del final de los experimentos, el posicionamiento de los electrodos fue confirmado de forma histológica mediante la tinción de rodajas del cerebro de los ratones con violeta de cresilo. Los electrodos que tenían la punta fuera del área deseada fueron descartados del análisis.

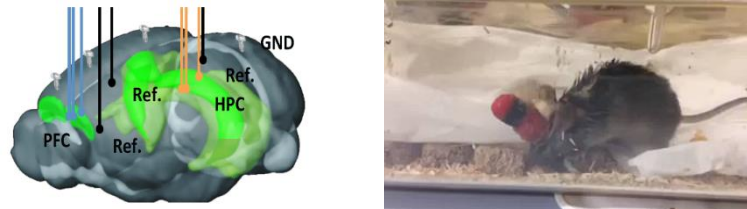


FIGURA 2: A LA IZQUIERDA, POSICIONAMIENTO DE LOS ELECTRODOS Y TORNILLOS EN EL CEREBRO DE LOS RATONES. GND INDICA EL POSICIONAMIENTO DEL TORNILLO USADO COMO TIERRA Y REF. INDICA LOS ELECTRODOS REFERENCIA, DE COLOR NEGRO EN LA IMAGEN. LOS ELECTRODOS DE COLOR AZUL SON AQUELLOS SITUADOS EN EL CPF Y LOS NARANJAS LOS SITUADOS EN EL HPC. A LA DERECHA, FOTOGRAFÍA DE UN RATÓN IMPLANTADO.

4.3. INYECCIONES

Los tratamientos fueron administrados con el ratón conectado a los cables de adquisición de datos electrofisiológicos, anteriormente a la llegada de la alumna. Una vez iniciada la grabación, se empezaron a administrar los diferentes tratamientos siguiendo la misma secuencia, que puede ser observada en la [tabla 1](#) y la [figura 3](#). Primero se grabó el estado basal sin perturbar al animal durante 30 minutos y pasado este tiempo se realizó una inyección de solución salina y se dejó al animal libre durante 30 minutos más. Esto se realizó de la misma forma para los tres estudios analizados en este trabajo. Una vez pasado este tiempo, en el primer estudio, se realizó una inyección de 10mg/kg de AS19 y se dejó al ratón durante 1h. Seguidamente, se inyectaron 8mg/kg de SB269970 en dos inyecciones de 4mg/kg espaciadas 30min. En este último período de tratamiento con SB269970 se dejó al ratón durante 1,5h desde la primera inyección para evaluar correctamente las fluctuaciones del efecto del tratamiento antes de parar la grabación. En el segundo estudio se inyectaron primero 4mg/kg de SB269970 y se dejó al ratón 1h para evaluar los efectos del tratamiento. Pasado este tiempo se realizó una segunda inyección de 10mg/kg de AS19 y se dejó al ratón durante 1h más. En el tercer estudio se realizaron dos inyecciones como en el segundo,

con la única diferencia estando en el primer compuesto administrado, el cual en este caso fue lurasidona en una concentración de 1mg/kg.

TABLA 1: TABLA CON LOS TIEMPOS DE INYECCIÓN DE CADA UNO DE LOS TRATAMIENTOS. CADA TIEMPO DE INYECCIÓN CORRESPONDE AL TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE EL INICIO DEL ENSAYO.

1	SALINO	AS19 (10mg/kg)	SB269970 (4mg/kg)	SB269970 (4mg/kg)
	30min	60min	120min	150min
2	SALINO	SB269970 (4mg/kg)	AS19 (10mg/kg)	-
	30min	60min	120min	-
3	SALINO	LURASIDONA (1mg/kg)	AS19 (10mg/kg)	-
	30min	60min	120min	-



FIGURA 3: PROTOCOLO EXPERIMENTAL. EXTRAÍDO DEL TRABAJO DE GENER ET AL., 2019.

4.4. RECOGIDA DE DATOS

La recogida de datos se realizó mediante los electrodos posicionados previamente en las regiones CPF y CA1 del cerebro de los ratones. Durante los procedimientos estos estaban conectados al cable de grabación y se recogieron los cambios de voltaje en estas zonas, lo que proporcionó información sobre la descarga de las neuronas y las oscilaciones neuronales. La actividad neuronal se grabó utilizando el software Open Ephys en 0.1-6000Hz y una tasa de muestreo de 30 kHz con amplificadores Intan RHD2132. Los datos extraídos de Open Ephys se guardaron en formato HDF5 (.hdf5). Las señales se procesaron *offline* para poder eliminar los artefactos de 50Hz correspondientes a las señales del entramado eléctrico del edificio. Seguidamente se analizaron los datos en continuo para poder observar la agregación de la actividad de las diferentes

neuronas alrededor del electrodo, lo que se conoce como análisis MUA por sus siglas en inglés (*Multi Unit Analysis*).

4.5. ANÁLISIS DE LOS DATOS

4.5.1. PROCESAMIENTO DE LOS DATOS

Para poder realizar el análisis MUA se utilizó un script de Python llamado “Puig_lab_analysis.py” que había sido previamente creado por miembros del laboratorio. Con este se pudieron extraer los diferentes canales de los datos de Open Ephys, sustituir la escala de bits a voltios y se guardaron en formato MATLAB descomprimido (.mat), como se puede observar en la [figura 4](#). Estos documentos en formato MATLAB se volvieron a procesar con un script de Python llamado “Puiglab_preprocessing.py” que también fue creado por previos miembros del laboratorio. En este segundo procesamiento de los archivos, se extrajeron y filtraron las grabaciones de cada uno de los electrodos y se guardaron de forma individual en archivos con formato Neuroexplorer (.nex). Concretamente, el archivo de Python asocia cada uno de los archivos con el adaptador apropiado del sistema y lo referencia con el mejor electrodo referencia para poder obtener el mejor ratio señal-ruido. Además, también se filtra la señal para poder reducir la frecuencia únicamente al rango de impulsos, es decir, entre 450 y 6000Hz.



FIGURA 4: SISTEMA DE ELECTROFISIOLOGÍA. LAS SEÑALES NEURONALES DEL RATÓN SE GRABARON MEDIANTE LOS ELECTRODOS IMPLANTADOS EN SU CEREBRO, ESTOS SE RECOGIERON Y GUARDARON EN ARCHIVOS UTILIZANDO EL SOFTWARE OPEN EPHYS Y LOS ARCHIVOS EXTRAÍDOS SE PROCESARON UTILIZANDO PYTHON.

4.5.2. CLASIFICACIÓN DE LAS SEÑALES CON OFFLINE SORTER

Offline sorter v3 (Plexon Inc.) es uno de los softwares de clasificación de potenciales de acción de la industria a día de hoy. Es capaz de reconocer potenciales de acción que han sido grabados mediante electrodos o estereotodos y tetrodos y clasificar las neuronas según un *principal component análisis* (PCA). Es capaz de reconocer *single neuron spikes* y hacer una selección de los datos de los potenciales de acción y separarlos del ruido. Los potenciales de acción se disponen en puntos 2D o 3D y el programa contiene diferentes técnicas de clasificación de estos (Plexon, s.f.).

Para este análisis los datos se cargaron en el programa en formato de archivo .nex y se visualizaron. Con ayuda de las herramientas del programa, tanto automáticas como manuales, se eliminaron todas aquellas señales que podían ser ruido y así se limpiaron todas las grabaciones de ruido una a una. Los datos obtenidos de esta clasificación se guardaron en archivos con formato Plexon (.plx). Los archivos que contenían mucho ruido o en los que el ruido no pudo ser separado fueron descartados del análisis.

4.5.2.1. USO DE OFFLINE SORTER

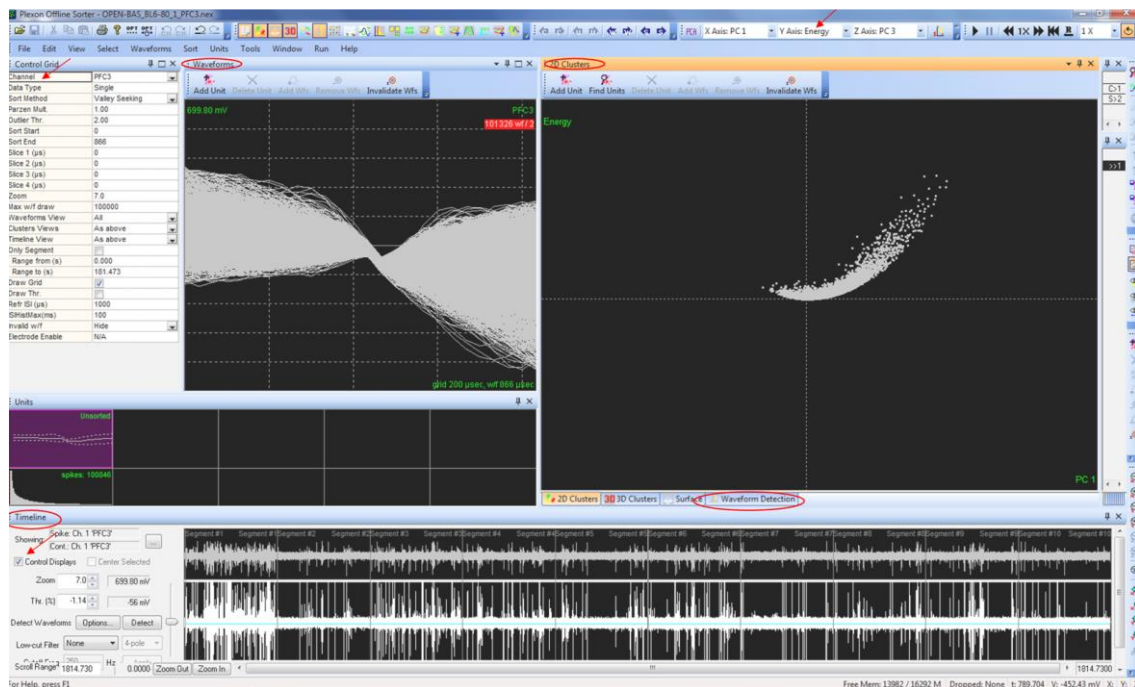


FIGURA 5: CAPTURA DE PANTALLA DEL PROGRAMA OFFLINE SORTER. MARCADOS EN ROJO TODOS AQUELLOS PUNTOS QUE SE MENCIONAN EN LA EXPLICACIÓN DEL APARTADO.

Al cargar los archivos en offline sorter estos se disponen como se puede observar en la [figura 5](#). Primero se debe de seleccionar en el “y axys” la opción de “energy”. Después, en el apartado de “*Waveform detection*” se puede determinar el umbral (“*threshold*”) de forma manual. En este punto se pueden ver todas las señales del archivo. Una vez se ha establecido el umbral en -3σ , se marca la casilla de “*control displays*” y se selecciona “*detect*” en el apartado de “*detect waveforms*” así las señales que entran en el umbral seleccionado se eliminan automáticamente. Y en el apartado de “*timeline*” aparece una nueva línea con las señales. Una vez establecido el umbral se puede seleccionar el apartado de “*2D clusters*” y aquí se pueden eliminar las señales que son claros *outliers*, es decir, de la forma más objetiva posible se determina si existen algunas señales claras que se encuentran muy alejadas del resto y se eliminan. Así se pueden eliminar las primeras señales de ruido. A continuación, se observan los potenciales de acción en el apartado “*waveforms*” y se eliminan aquellos que se salen del grupo y/o forma principal, así como aquellos que contienen una clara forma de *zigzag*. De esta forma, siguiendo ventanas de unos 50s se hace una pasada por todo el archivo eliminando aquellas señales que pertenecen a la categoría de ruido y únicamente se dejan aquellas que se consideran potenciales de acción.

Para un buen análisis de los potenciales de acción se deben de eliminar también los segundos de las inyecciones, debido a que son las zonas del archivo con más ruido y no es debido al efecto del tratamiento sino al estrés que sufre el animal al ser manipulado. Estas zonas son de fácil identificación debido a su forma y a su marca temporal, ya que en todos los canales de un animal se encuentran en la misma posición.

4.5.3. ANÁLISIS MUA

Para realizar el análisis de los archivos Plexon se modificó un programa de Python ya existente, creado por previos miembros del laboratorio. Este archivo se modificó para poder obtener dos programas diferentes, uno para el estudio con tres administraciones de tratamientos y el otro para los estudios con dos administraciones, tal y como se muestra en la [figura 6](#).

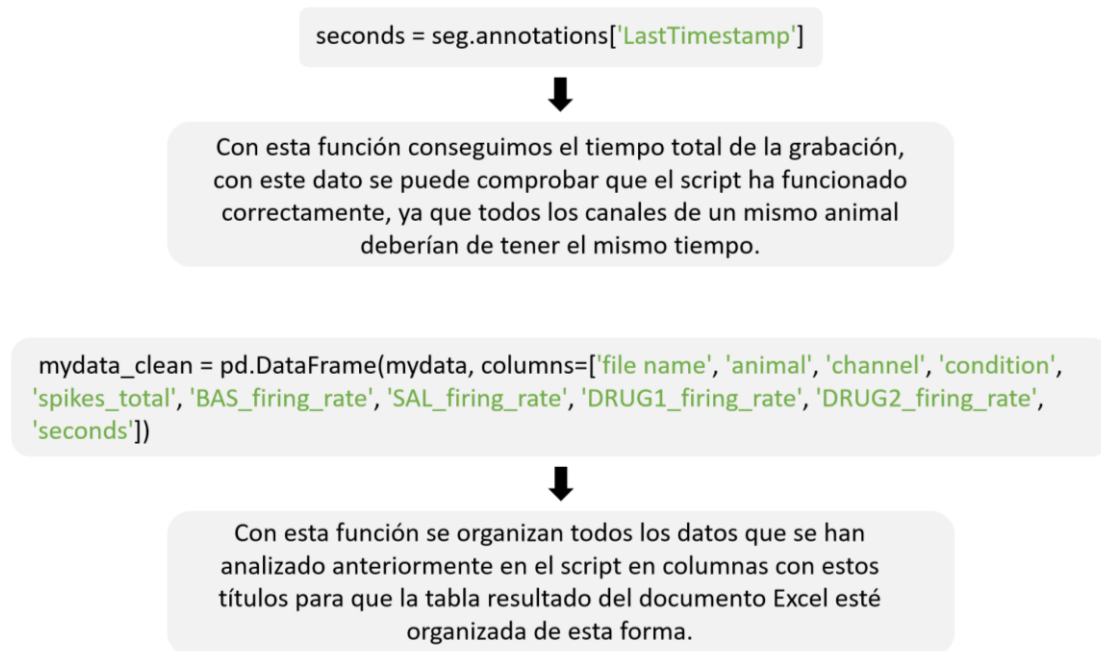


FIGURA 6: EJEMPLOS DE FUNCIONES MODIFICADAS EN EL SCRIPT DE PYTHON PARA PODER REALIZAR EL ANÁLISIS DE LOS DATOS.

Estos programas usan la librería de Python Pandas DataFrame (<https://pandas.pydata.org/>) para poder clasificar cada archivo como diferentes etiquetas denominadas como “keys” en la librería de Panda. Las etiquetas usadas en este caso son: animal, canal, señales totales y tasa de descarga (*firing rate*) basal, en salino, con agonista y con antagonista (figura 6). Con esto, de este código se pudo extraer información sobre el canal, la tasa de descarga para cada condición (es decir, la tasa de descarga del potencial de acción) que es calculada con el número total de potenciales de acción entre el tiempo de la condición. Para el análisis de los datos del experimentos con doble inyección de SB269970 se modificaron también los tiempos cogidos para hacer la media de los potenciales de acción, ya que el cambio en el patrón de inyección también cambió el tiempo en el que se realizaron las inyecciones, como se puede observar en la tabla 1. Además también se añadió una nueva columna en el Excel denominada “DRUG3_firing_rate”. Este código dio como resultado un Excel (.xlsx) con todos estos datos.

Para poder obtener una vista sencilla de los resultados obtenidos en el análisis se modificó un código de Python ya existente en el laboratorio para poder adaptarlo a las necesidades de estos estudios y se nombró “firingrateplot.py”. En

concreto se modificaron los nombres de los grupos y el nombre del gráfico para que coincidiera con las necesidades de cada uno de los experimentos y para el experimento de dos inyecciones de SB269970 se añadió un tercer grupo denominado SB702. Con este código se pudieron obtener diferentes *boxplots* para cada estudio. El análisis estadístico de los datos extraídos del análisis MUA fue realizado a partir de Análisis de la Varianza (ANOVA) en SPSS.

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISIS MUA

Con el análisis MUA de los diferentes experimentos se pudieron observar las variaciones de las descargas neuronales. En el caso del experimento 1, es decir, el tratamiento con AS19-SB269970-SB269970 se intentó entender la función del receptor con una dosis de agonista e intentando revertir el efecto de este con un antagonista.

En el hipocampo la acción del agonista se observó que hace que la descarga neuronal descienda de forma significativa respecto al basal, y el antagonista no revierte este efecto, la descarga neuronal sigue siendo baja, como se puede observar en la [figura 7](#). El análisis estadístico indicó que en la comparación de la descarga basal respecto a la descarga con cada uno de los tres tratamientos sin tener en cuenta la inyección de salino fue prácticamente significativa ($p=0.088$) ([tabla 2 del anexo 1](#)). Para comprobar las diferencias entre la media de descargas en el estado basal con las descargas con la dosis de agonista y tras la segunda dosis de antagonista se realizó un segundo ANOVA teniendo en cuenta solo estos tres grupos y este resultó significativo ($p=0.035$) ([tabla 3 del anexo 1](#)). El análisis también mostró que hay una diferencia significativa entre las medias de las descargas de los animales, como los datos no se pudieron considerar esféricos según el test de Mauchly ($p=0.020$) ([tabla 4 del anexo 1](#)), en este caso $p=0.005$ ([tabla 5 del anexo 1](#)), pero esta diferencia entre los animales no afecta a la comparación entre los tratamientos. Para demostrar esto se realizó un test de Bonferroni para poder comparar la diferencia entre grupos. El resultado de este test fue significativo para la comparación entre el estado basal y después de la administración de AS19 ($p=0.017$) y para la comparación entre

el estado basal y después de la segunda administración de SB269970 ($p=0.018$) (tabla 6 del anexo 1).

En el córtex prefrontal las diferencias observadas en el hipocampo se mantuvieron e incluso pueden parecer más pronunciadas si se observa la figura 7, pero en cambio el análisis estadístico no mostró ninguna significancia en los resultados. Se realizaron dos ANOVAS de la misma forma que se hizo con el hipocampo, pero ambas de ellas resultaron no significativas con una $p=0.158$ para el análisis con los valores de las dos inyecciones de SB269970 (tabla 7 del anexo 1), y $p=0.189$ para el análisis con únicamente los valores después de la segunda inyección de SB269970 (tabla 8 del anexo 1).

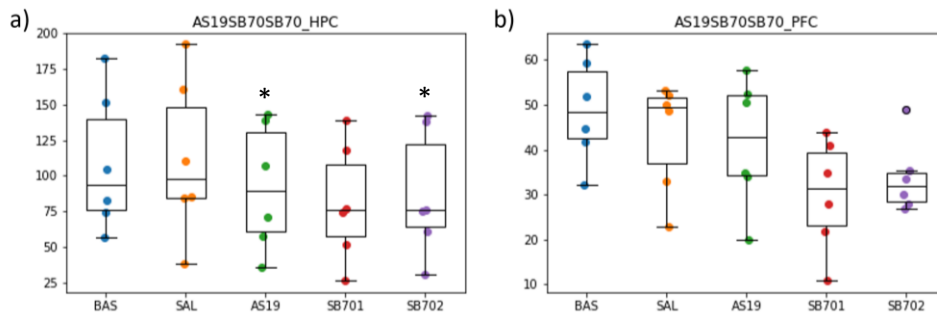


FIGURA 7: GRÁFICOS QUE REPRESENTAN LA MEDIA DE DESCARGAS NEURONALES PARA CONDICIÓN DENTRO DEL EXPERIMENTO 1. SB701 HACE REFERENCIA A LA PRIMERA DOSIS DE SB269970 Y SB702 HACE REFERENCIA A LA SEGUNDA DOSIS. GRÁFICOS OBTENIDOS MEDIANTE LA EJECUCIÓN DEL SCRIPT DE PYTHON “FIRINGRATEPLOT.PY”. LAS BARRAS DE ERROR REPRESENTAN LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR $N=6$. * REPRESENTA $p < 0.05$. A) DESCARGAS NEURONALES EN EL HIPOCAMPO. B) DESCARGAS NEURONALES EN EL CÓRTEX PREFRONTAL.

Para comprobar que el antagonista realmente no tenía ningún efecto sobre el receptor se realizó el experimento 2, es decir la inyección de SB269970 primero y después se inyectó AS19. En este caso, se pudo observar como en el hipocampo no se obtuvieron diferencias entre las medias de las descargas en la inyección de salino y la de SB269970 pero sí que se vio una clara disminución de las descargas después de la inyección de AS19. Aunque estos cambios pudieran parecer prominentes en la figura 8, estos no se consideraron significativos según el análisis estadístico. Los resultados del ANOVA mostraron que las variaciones no eran significativas ($p=0.085$) (tabla 9 del anexo 2). Como

el valor de p era bajo, se realizó un test de Bonferroni para poder valorar las diferencias entre grupos. Según el test de Mauchly, se pudo asumir la esfericidad de los datos dado que $p=0.116$ (tabla 10 anexo 2). Con este dato se observó la variación entre animales era significativa ($p=0.017$) (tabla 11 anexo 2). La diferencia entre animales pudo afectar a la diferencia entre grupos, la cual no es significativa para ninguna comparación (tabla 12 anexo 2).

Por el contrario, en el córtex prefrontal se pudo observar una disminución de las descargas con ambos tratamientos pero que era notablemente mayor con la administración de AS19, como se puede ver en la figura 8. Para comprobar si estas diferencias eran significativas se realizó un ANOVA que demostró que estas diferencias no eran significativas dando como resultado una $p=0.360$ (tabla 13 anexo 2).

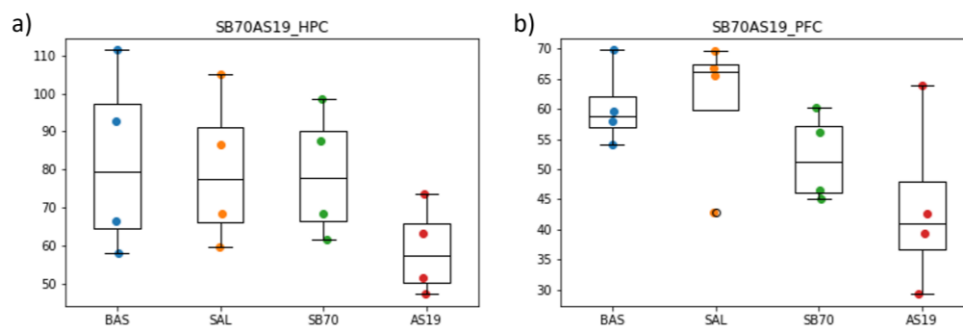


FIGURA 8: GRÁFICOS QUE REPRESENTAN LA MEDIA DE POTENCIALES DE ACCIÓN PARA CONDICIÓN DENTRO DEL EXPERIMENTO 2. GRÁFICOS OBTENIDOS MEDIANTE LA EJECUCIÓN DEL SCRIPT DE PYTHON “FIRINGRATEPLOT.PY”. LAS BARRAS DE ERROR REPRESENTAN LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR $N=4$. A) DESCARGAS NEURONALES EN EL HIPOCAMPO. B) DESCARGAS NEURONALES EN EL CÓRTEX PREFRONTAL.

Una vez observado el comportamiento del receptor con el antagonista y el agonista y caracterizado el efecto de este sobre las descargas neuronales, se procedió a realizar un ensayo farmacológico con lurasidona para poder determinar el impacto que tiene el receptor en el efecto de este medicamento. Para ello se evaluó el efecto de la lurasidona y el efecto de una posterior administración de una dosis de agonista selectivo de 5-HT₇R (AS19).

En el caso del HPC se observó una disminución ligera de las descargas neuronales después de la administración de lurasidona que posteriormente fue

levemente revertida con la administración de AS19 (figura 9). No obstante, estas observaciones no fueron significativas, tal y como muestra el ANOVA realizado, que dio como resultado una $p=0.458$ (tabla 14 anexo 3).

En el CPF se vio que la disminución de las descargas tras la inyección de lurasidona era mucho más pronunciada, y se mantuvo con la inyección de AS19 (figura 9). En este caso, como ocurrió en el hipocampo, esta variación no fue significativa estadísticamente, debido a que el ANOVA mostró una $p=0.260$ (tabla 15 anexo 3).

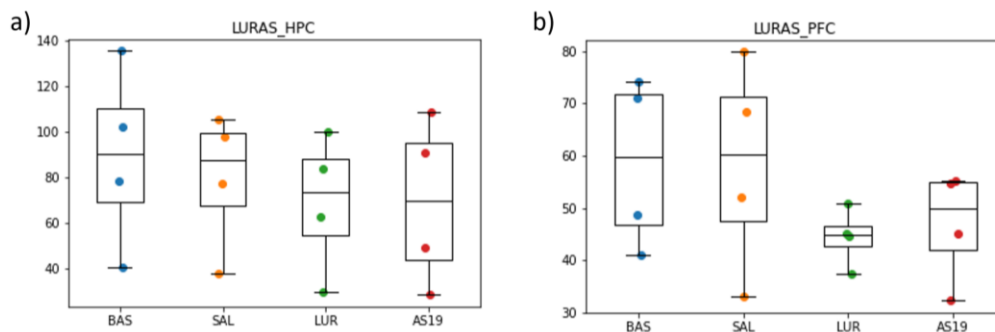


FIGURA 9: GRÁFICOS QUE REPRESENTAN LA MEDIA DE POTENCIALES DE ACCIÓN PARA CONDICIÓN DENTRO DEL EXPERIMENTO 3. GRÁFICOS OBTENIDOS MEDIANTE LA EJECUCIÓN DEL SCRIPT DE PYTHON “FIRINGRATEPLOT.PY”. LAS BARRAS DE ERROR REPRESENTAN LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR $N=4$. A) DESCARGAS NEURONALES EN EL HIPOCAMPO. B) DESCARGAS NEURONALES EN EL CÓRTEX PREFRONTAL.

6. DISCUSIÓN

Con los resultados obtenidos se pudo caracterizar el efecto del receptor 5-HT7 en el HPC y en el CPF. Una dosis de agonista selectivo, AS19 en este caso, fue capaz de activar 5-HT7R. Como se puede observar en los resultados del MUA, aunque la activación de 5-HT7R no disminuyera las descargas de forma drástica en hipocampo, la disminución es significativa, lo que implica que es constante a lo largo de todos los animales. Esto es indicativo de que una activación del receptor implica una disminución de las descargas neuronales en el hipocampo. Esta disminución no pudo ser revertida ni por una ni por dos dosis de antagonista selectivo (SB269970). Esto puede ser debido a que la dosis de AS19 administrada es demasiado elevada para poder evaluar de forma efectiva la inactivación del receptor. AS19 es un agonista selectivo de 5-HT7R con una gran

afinidad (Meneses et al., 2008), esto podría ser el motivo de que la dosis del ligando fuera demasiado elevada. Debido a que 5-HT₇R es un receptor poco estudiado, no hay todavía ninguna referencia de los efectos de este receptor en estudios de electrofisiología lo que puede llevar a obtener resultados como los mostrados anteriormente. Será necesario realizar experimentos de dosis acumuladas (crecientes) para poder establecer cómo distintas dosis de AS19 afectan a la actividad el circuito prefrontal-hipocampal.

Se ha observado que los animales tienen unos valores de descargas significativamente diferentes cuando se comparan los unos con los otros, lo que es de esperar dado que estos son seres vivos complejos los cuales se ven afectados por muchas variables. Dada esta variabilidad natural, será necesario ampliar el número de animales por grupo para identificar efectos consistentes de los fármacos.

En el córtex prefrontal, en cambio, esta disminución no fue visible, aunque sí que se pudo observar una tendencia de descenso de descargas con la inyección de SB269970, aunque no significativa. Para poder comprobar que realmente SB269970 es un antagonista neutro (no tiene efecto por sí solo) se realizó un segundo experimento en el que se administró una dosis de SB269970 primero. Con este experimento se pudo demostrar que el bloqueo de 5-HT₇R mediante un antagonista selectivo de este receptor no ejerce ningún cambio en la media de descargas ni en el HPC ni en el CPF.

En este segundo experimento se pudo comprobar la efectividad de AS19 como activador de 5-HT₇R y el efecto de esta activación. Después de una dosis de SB269970, se administró una dosis de AS19. Según los resultados del MUA, se pudo observar que AS19 en efecto es un agonista de 5-HT₇R con una gran afinidad por el receptor, tal y como se vio en previos estudios (Meneses et al., 2008), debido a que es capaz de unirse a este y activarlo aun cuando el receptor se encuentra bloqueado por el antagonista. Este experimento volvió a mostrar la disminución de las descargas neuronales con la activación de 5-HT₇R en hipocampo pero no en prefrontal, aunque no de forma significativa. El hecho de que la disminución no fuera significativa pero el valor de p fuera muy bajo muestra que quizá sí que haya una disminución significativa pero no es visible

debido a la disminución en el número de animales de este experimento respecto al primero (6 ratones vs. 4 ratones).

Después del estudio de los efectos de la activación y el bloqueo selectivo de 5-HT7R se procedió con el estudio de los efectos de la activación del receptor después de la administración de lurasidona, que como se ha comentado anteriormente es un antipsicótico que se une a diferentes receptores, entre ellos es un fuerte antagonista de 5-HT7R (Azhar & Shaban, 2022). En este experimento se pudo observar como la administración de lurasidona no ejercía cambios significativos ni en el HPC ni en el CPF según el MUA. No obstante, sí que se observó una tendencia a disminuir la media de descargas neuronales en el CPF. Después de la dosis de lurasidona se administró una dosis de AS19, para poder evaluar el efecto de la activación de 5-HT7R sobre los efectos del medicamento. Según los resultados del MUA, la activación de 5-HT7R no ejerció un cambio en el número de descargas neuronales, es decir, no revirtió los efectos de la lurasidona. Esto implica que el efecto conjunto de los receptores en los que actúa la lurasidona sobre el MUA es mucho más fuerte que el efecto de la activación única de 5-HT7R.

7. CONCLUSIÓN

Con los resultados obtenidos del MUA se puede concluir que la activación de 5-HT7R implica una disminución en el número de descargas neuronales en el HPC pero no en el CPF. Al contrario de lo que se propuso en un inicio. Esto se debe a la complejidad de la zona en la que se encuentra expresado el receptor y el poco conocimiento que hay sobre la misma. Lo que puede apuntar a que aun siendo un receptor excitatorio, su activación implica una inhibición de la activación neuronal en estas zonas. Esto debería de ser más extensamente estudiado para poder evaluar el efecto del receptor en profundidad y poder comprender exactamente porque su activación se observa como un descenso en la actividad en MUA. También se ha podido observar en MUA que el bloqueo de 5-HT7R por SB269970 no ejerce ningún efecto en el número de descargas neuronales.

Para poder acabar de caracterizar el efecto de la activación de 5-HT7R es necesario continuar analizando los datos extraídos y realizar el análisis de las

oscilaciones neuronales registradas a través de los mismos electrodos intracerebrales (ondas gamma y theta entre otros). De esta forma se podría obtener un buen conocimiento del comportamiento de este receptor según técnicas de electrofisiología. También sería necesario la repetición de estos experimentos con una dosis menor de AS19 para poder observar el efecto que tiene la inactivación de 5-HT7R, así como obtener datos de más animales para poder realizar una correcta evaluación de la significancia estadística de los datos.

En cuanto a los estudios con lurasidona, según el MUA, se ha observado que la lurasidona ejerce una disminución en las descargas neuronales en CPF, que se puede observar también de forma más ligera en HPC, que es lo esperado, dado que los antipsicóticos disminuyen la actividad neuronal (Gener et al., 2019), aunque en ninguno de los casos de forma significativa. También se ha visto que la activación de 5-HT7R después de la administración de lurasidona no revierte los efectos de este primer tratamiento, al contrario de lo que se propuso al inicio. Lo que implica que los efectos de la lurasidona que se pueden observar en el MUA son causados por la actuación sinérgica de más de un receptor y la activación de 5-HT7R no es suficientemente potente como para bloquearlos o revertirlos. Estas conclusiones han sido extraídas de un estudio con una n=4 y la repetición de este con más animales sería necesaria para poder evaluar de forma más efectiva los efectos del tratamiento y del receptor sobre el MUA.

Estas observaciones forman parte de un estudio preliminar del receptor 5-HT7R para la comprensión de los efectos de la activación de este receptor y serán incluidos en un artículo que será publicado próximamente. Este estudio se ha realizado para poder obtener una base de conocimiento de los efectos de este receptor para poder ser seguido por un estudio similar realizado en ratones con esquizofrenia inducida farmacológicamente (Delgado-Sallent et al., 2022) en los cuales se quiere comprobar el efecto de distintos tratamientos.

8. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no habría sido posible sin la colaboración de grupo PuigLab del ICN2 los cuales han compartido conocimientos, datos y resultados. En especial la Dra. Maria Victoria Puig, que ha sido mi tutora profesional en las prácticas y que ha compartido sus conocimientos en el tema conmigo y me ha enseñado a realizar

el análisis de los datos. También al Dr. Thomas Gener, que me ha enseñado los procedimientos quirúrgicos y ha respondido a todas las preguntas que me han surgido al respecto. Este trabajo tampoco podría haber sido posible sin la ayuda de mis compañeros de laboratorio Cristina López Cabezón, que me ha enseñado el funcionamiento del software offline sorter y João Morais, que me ha ayudado a comprender los aspectos técnicos de los scripts de Python.

9. AUTOEVALUACIÓN

Mediante este trabajo he podido obtener diferentes conocimientos científicos diferentes a los realizados durante el grado. En las prácticas he podido aprender de los Drs. Maria Victoria Puig y Thomas Gener que me han enseñado a trabajar en un laboratorio de investigación y a analizar el trabajo de forma crítica y objetiva.

En relación a las técnicas de análisis de datos realizadas para este trabajo, he aprendido a programar con Python y he sido capaz de comprender y modificar scripts ya escritos para poder adaptarlos a las necesidades de mi trabajo. Además, he tenido la oportunidad de trabajar con el programa Offline Sorter v3 (Plexon Inc.), uno de los principales programas para el análisis de la actividad neuronal y los potenciales de acción de las neuronas. Así, he aprendido a diferenciar la actividad biológica del cerebro del ruido y también he podido observar la activación de neuronas individuales con este programa. También he tenido la oportunidad de repasar la estadística aprendida durante la carrera y he aprendido a utilizar el programa SPSS para poder realizar ANOVAs y otras determinaciones estadísticas.

Durante la realización de las prácticas asociadas a este trabajo he aprendido a trabajar en grupo con mis compañeros en el laboratorio, los cuales me han enseñado a utilizar los diferentes programas y me han ayudado cuando he tenido alguna duda. He aprendido a realizar mis procesos y a evaluar los resultados de forma independiente y con supervisión de mi tutora de prácticas. También he tenido la oportunidad de continuar el análisis estadístico estando de Erasmus y he podido realizar los análisis estadísticos aun estando en otro país.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez, B. D., Morales, C. A., & Amodeo, D. A. (2021). Impact of specific serotonin receptor modulation on behavioral flexibility. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 209, 173243. <https://doi.org/10.1016/J.PBB.2021.173243>
- Azhar, Y., & Shaban, K. (2022). Lurasidone. *Pharma-Kritik*, 36(8), 169–177. <https://doi.org/10.1007/s40263-012-0026-x>
- Castañé, A., Santana, N., & Artigas, F. (2015). PCP-based mice models of schizophrenia: differential behavioral, neurochemical and cellular effects of acute and subchronic treatments. *Psychopharmacology*, 232(21–22), 4085–4097. <https://doi.org/10.1007/S00213-015-3946-6>
- Chen, W. N., & Yeong, K. Y. (2020). Scopolamine, a Toxin-Induced Experimental Model, Used for Research in Alzheimer's Disease. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 19(2), 85–93. <https://doi.org/10.2174/1871527319666200214104331>
- Cristiano, V. B., Szortyka, M. F., & Belmonte-de-Abreu, P. (2023). A controlled open clinical trial of the positive effect of a physical intervention on quality of life in schizophrenia. *Frontiers in Psychiatry*, 14, 284. <https://doi.org/10.3389/FPSYT.2023.1066541>
- Delgado-Sallent, C., Nebot, P., Gener, T., Fath, A. B., Timplallexi, M., & Puig, M. V. (2022). Atypical, but Not Typical, Antipsychotic Drugs Reduce Hypersynchronized Prefrontal-Hippocampal Circuits during Psychosis-Like States in Mice: Contribution of 5-HT_{2A} and 5-HT_{1A} Receptors. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 32(16), 3472–3487. <https://doi.org/10.1093/CERCOR/BHAB427>
- Gener, T., Tauste-Campo, A., Alemany-González, M., Nebot, P., Delgado-Sallent, C., Chanovas, J., & Puig, M. V. (2019). Serotonin 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} and dopamine D₂ receptors strongly influence prefronto-hippocampal neural networks in alert mice: Contribution to the actions of risperidone. *Neuropharmacology*, 158. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2019.107743>
- Hagan, J. J., Price, G. W., Jeffrey, P., Deeks, N. J., Stean, T., Piper, D., Smith, M. I., Upton, N., Medhurst, A. D., Middlemiss, D. N., Riley, G. J., Lovell, P. J., Bromidge, S. M., & Thomas, D. R. (2000). Characterization of SB-269970-A, a selective 5-HT(7) receptor antagonist. *British Journal of Pharmacology*, 130(3), 539–548. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0703357>
- Higa, G. S. V., Francis-Oliveira, J., Carlos-Lima, E., Tamais, A. M., Borges, F. da S., Kihara, A. H., Shieh, I. C., Ulrich, H., Chiavegatto, S., & De Pasquale, R. (2022). 5-HT-dependent synaptic plasticity of the prefrontal cortex in postnatal development. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-022-23767-9>
- Lee, G., & Zhou, Y. (2019). NMDAR Hypofunction Animal Models of Schizophrenia. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12, 185. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2019.00185/BIBTEX>
- Liu, D., Meyer, D., Fennessy, B., Feng, C., Cheng, E., Johnson, J. S., Park, Y. J., Rieder, M.-K., Ascolillo, S., de Pins, A., Dobbyn, A., Lebovitch, D., Moya, E., Nguyen, T.-H., Wilkins, L., Hassan, A., Aghanwa, H. S., Ansari, M., Asif, A., ... Charney, A. W. (2023). Schizophrenia risk conferred by rare protein-truncating variants is conserved across diverse human

- populations. *Nature Genetics* 2023 55:3, 55(3), 369–376.
<https://doi.org/10.1038/s41588-023-01305-1>
- Maisonial-Besset, A., Mangeant, R., Dubost, E., Cailly, T., & Collot, V. (2022). *Radiotracers for the Central Serotonergic System*. <https://doi.org/10.3390/ph15050571>
- Maric, N. P., Jovicic, M. J., Mihaljevic, M., & Miljevic, C. (2016). Improving Current Treatments for Schizophrenia. *Drug Development Research*, 77(7), 357–367.
<https://doi.org/10.1002/DDR.21337>
- Meneses, A., Perez-Garcia, G., Liy-Salmeron, G., Flores-Galvez, D., Castillo, C., & Castillo, E. (2008). The effects of the 5-HT₆ receptor agonist EMD and the 5-HT₇ receptor agonist AS19 on memory formation. *Behavioural Brain Research*, 195(1), 112–119.
<https://doi.org/10.1016/J.BBR.2007.11.023>
- Nikiforuk, A. (2015). Targeting the Serotonin 5-HT₇ Receptor in the Search for Treatments for CNS Disorders: Rationale and Progress to Date. *CNS Drugs*, 29(4), 265–275.
<https://doi.org/10.1007/S40263-015-0236-0>
- Okubo, R., Hasegawa, T., Fukuyama, K., Shiroyama, T., & Okada, M. (2021). Current Limitations and Candidate Potential of 5-HT₇ Receptor Antagonism in Psychiatric Pharmacotherapy. *Frontiers in Psychiatry*, 12, 623684. <https://doi.org/10.3389/FPSYT.2021.623684>
- Owen, M. J., Sawa, A., & Mortensen, P. B. (2016). Schizophrenia. *Lancet (London, England)*, 388(10039), 86–97. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01121-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01121-6)
- Pytliak, M., Vargová, V., Mechírová, V., & Felšci, M. (2011). Serotonin receptors - from molecular biology to clinical applications. *Physiological Research*, 60(1), 15–25.
<https://doi.org/10.33549/PHYSIOLRES.931903>
- Quintero-Villegas, A., & Valdés-Ferrer, S. I. (2019). Role of 5-HT₇ receptors in the immune system in health and disease. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, 26(1).
<https://doi.org/10.1186/S10020-019-0126-X>
- Quintero-Villegas, A., & Valdés-Ferrer, S. I. (2022). Central nervous system effects of 5-HT₇ receptors: a potential target for neurodegenerative diseases. *Molecular Medicine* 2022 28:1, 28(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S10020-022-00497-2>
- Roberts, A. J., & Hedlund, P. B. (2012). The 5-HT(7) receptor in learning and memory. *Hippocampus*, 22(4), 762–771. <https://doi.org/10.1002/HIPO.20938>
- Sarrouilhe, D., Defamie, N., & Mesnil, M. (2021). Is the Exosome Involved in Brain Disorders through the Serotonergic System? *Biomedicines*.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines9101351>
- Sengul, G., & Watson, C. (2012). Spinal Cord. *The Mouse Nervous System*, 424–458.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-369497-3.10013-5>
- Stępnicki, P., Kondej, M., & Kaczor, A. A. (2018). Current Concepts and Treatments of Schizophrenia. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(8).
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES23082087>
- Štrac, D. Š., Pivac, N., & Mück-Šeler, D. (2016). The serotonergic system and cognitive function. *Translational Neuroscience*, 7(1), 35. <https://doi.org/10.1515/TNSCI-2016-0007>

- Thirumaran, S. L., Lepailleur, A., & Rochais, C. (2019). Structure-activity relationships of serotonin 5-HT₇ receptors ligands: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *183*, 111705. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2019.111705>
- Vasiliiu, O. (2023). The current state of research for psychobiotics use in the management of psychiatric disorders-A systematic literature review. *Frontiers in Psychiatry*, *14*. <https://doi.org/10.3389/FPSYT.2023.1074736>
- Winship, I. R., Dursun, S. M., Baker, G. B., Balista, P. A., Kandratavicius, L., Maia-de-Oliveira, J. P., Hallak, J., & Howland, J. G. (2019). An Overview of Animal Models Related to Schizophrenia. *Canadian Journal of Psychiatry. Revue Canadienne de Psychiatrie*, *64*(1), 5–17. <https://doi.org/10.1177/0706743718773728>

11. Anexos

11.1. ANEXO 1: TABLAS ESTADÍSTICAS PARA EL EXPERIMENTO 1

11.1.1. HPC

TABLA 2: RESULTADOS DE *REPEATED MEASURES ANOVA* DE LOS DATOS DEL HPC DEL EXPERIMENTO 1. COMO GRUPOS A COMPARAR: BASAL, AS19, SB701 Y SB702.

		Multivariate Tests ^a							
Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.	Partial Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power ^c
factor1	Pillai's Trace	.857	5.974 ^b	3.000	3.000	.088	.857	17.923	.457
	Wilks' Lambda	.143	5.974 ^b	3.000	3.000	.088	.857	17.923	.457
	Hotelling's Trace	5.974	5.974 ^b	3.000	3.000	.088	.857	17.923	.457
	Roy's Largest Root	5.974	5.974 ^b	3.000	3.000	.088	.857	17.923	.457

- a. Design: Intercept
Within Subjects Design: factor1
- b. Exact statistic
- c. Computed using alpha = .05

TABLA 3: RESULTADOS DE *REPEATED MEASURES ANOVA* DE LOS DATOS DEL HPC DEL EXPERIMENTO 1. COMO GRUPOS A COMPARAR: BASAL, AS19 Y SB702.

		Multivariate Tests ^a							
Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.	Partial Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power ^c
factor1	Pillai's Trace	.812	8.651 ^b	2.000	4.000	.035	.812	17.303	.694

Wilks' Lambda	.188	8.651 ^b	2.000	4.000	.035	.812	17.303	.694
Hotelling's Trace	4.326	8.651 ^b	2.000	4.000	.035	.812	17.303	.694
Roy's Largest Root	4.326	8.651 ^b	2.000	4.000	.035	.812	17.303	.694

- a. Design: Intercept
Within Subjects Design: factor1
- b. Exact statistic
- c. Computed using alpha = .05

TABLA 4: RESULTADOS DEL TEST DE ESFEREICIDAD DEL *REPEATED MEASURES* ANOVA DE LOS DATOS DEL HPC DEL EXPERIMENTO 1. COMO GRUPOS A COMPARAR: BASAL, AS19 Y SB702.

Mauchly's Test of Sphericity^a

Measure: MEASURE_1

Within Subjects Effect	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	df	Sig.	Epsilon ^b		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Lower-bound
factor1	.143	7.779	2	.020	.539	.569	.500

Tests the null hypothesis that the error covariance matrix of the orthonormalized transformed dependent variables is proportional to an identity matrix.

- a. Design: Intercept
Within Subjects Design: factor1
- b. May be used to adjust the degrees of freedom for the averaged tests of significance. Corrected tests are displayed in the Tests of Within-Subjects Effects table.

TABLA 5: RESULTADOS DE LA VARIACIÓN ENTRE GRUPOS *DEL REPEATED MEASURES* ANOVA DE LOS DATOS DEL HPC DEL EXPERIMENTO 1. COMO GRUPOS A COMPARAR: BASAL, AS19 Y SB702.

Tests of Within-Subjects Effects

Measure: MEASURE_1

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power ^a
factor 1	Sphericity Assumed	3251.16	1625.558	20.601	<.001	.805	41.202	.999
	Greenhouse-Geisser	3251.16	3018.598	20.601	.005	.805	22.188	.960
	Huynh-Feldt	3251.16	2858.258	20.601	.004	.805	23.433	.968
	Lower-bound	3251.16	3251.116	20.601	.006	.805	20.601	.947
Error(factor 1)	Sphericity Assumed	789.061	78.906					
	Greenhouse-Geisser	789.061	146.526					
	Huynh-Feldt	789.061	138.743					
	Lower-bound	789.061	157.812					

a. Computed using alpha = .05

TABLA 6: RESULTADOS DEL TEST DE BONFERRONI DEL *REPEATED MEASURES ANOVA* DE LOS DATOS DEL HPC DEL EXPERIMENTO 1. COMO GRUPOS A COMPARAR: BASAL, AS19 Y SB702.

Pairwise Comparisons

Measure: MEASURE_1

(I) factor1	(J) factor1	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	28.538*	6.137	.017	6.850	50.226
	3	28.481*	6.267	.018	6.332	50.629
2	1	-28.538*	6.137	.017	-50.226	-6.850
	3	-.057	1.404	1.000	-5.019	4.905
3	1	-28.481*	6.267	.018	-50.629	-6.332
	2	.057	1.404	1.000	-4.905	5.019

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the .05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

11.1.2. CPF

TABLA 7: RESULTADOS DE *REPEATED MEASURES ANOVA* DE LOS DATOS DEL CPF DEL EXPERIMENTO 1. COMO GRUPOS A COMPARAR: BASAL, AS19, SB701 Y SB702

		Multivariate Tests ^a							
Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.	Partial Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power ^c
factor1	Pillai's Trace	.785	3.643 ^b	3.000	3.000	.158	.785	10.930	.308
	Wilks' Lambda	.215	3.643 ^b	3.000	3.000	.158	.785	10.930	.308
	Hotelling's Trace	3.643	3.643 ^b	3.000	3.000	.158	.785	10.930	.308
	Roy's Largest Root	3.643	3.643 ^b	3.000	3.000	.158	.785	10.930	.308

a. Design: Intercept
Within Subjects Design: factor1

b. Exact statistic

c. Computed using alpha = .05

TABLA 8: RESULTADOS DE *REPEATED MEASURES ANOVA* DE LOS DATOS DEL CPF DEL EXPERIMENTO 1. COMO GRUPOS A COMPARAR: BASAL, AS19 Y SB702.

		Multivariate Tests ^a							
Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.	Partial Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power ^c
factor1	Pillai's Trace	.565	2.595 ^b	2.000	4.000	.189	.565	5.190	.272

Wilks' Lambda	.435	2.59 5 ^b	2.000	4.00 0	.189	.565	5.190	.272
Hotelling's Trace	1.29 8	2.59 5 ^b	2.000	4.00 0	.189	.565	5.190	.272
Roy's Largest Root	1.29 8	2.59 5 ^b	2.000	4.00 0	.189	.565	5.190	.272

- a. Design: Intercept
Within Subjects Design: factor1
- b. Exact statistic
- c. Computed using alpha = .05

11.2. ANEXO 2: TABLAS ESTADÍSTICAS PARA EL EXPERIMENTO 2

11.2.1. HPC

TABLA 9: RESULTADOS DE *REPEATED MEASURES ANOVA* DE LOS DATOS DEL HPC DEL EXPERIMENTO 2. COMO GRUPOS A COMPARAR: BASAL, SB70 Y AS19.

		Multivariate Tests ^a							
Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.	Partial Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power ^c
factor1	Pillai's Trace	.915	10.756 ^b	2.000	2.000	.085	.915	21.513	.445
	Wilks' Lambda	.085	10.756 ^b	2.000	2.000	.085	.915	21.513	.445
	Hotelling's Trace	10.756	10.756 ^b	2.000	2.000	.085	.915	21.513	.445
	Roy's Largest Root	10.756	10.756 ^b	2.000	2.000	.085	.915	21.513	.445

- a. Design: Intercept
Within Subjects Design: factor1
- b. Exact statistic
- c. Computed using alpha = .05

TABLA 10: RESULTADOS DEL TEST DE ESFEREICIDAD DEL *REPEATED MEASURES* ANOVA DE LOS DATOS DEL HPC DEL EXPERIMENTO 2. COMO GRUPOS A COMPARAR: BASAL, SB70 Y AS19.

Mauchly's Test of Sphericity^a

Measure: MEASURE_1

Within Subjects Effect	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	df	Sig.	Greenhouse-Geisser	Epsilon ^b	
						Huynh-Feldt	Lower-bound
factor1	.116	4.312	2	.116	.531	.579	.500

Tests the null hypothesis that the error covariance matrix of the orthonormalized transformed dependent variables is proportional to an identity matrix.

a. Design: Intercept

Within Subjects Design: factor1

b. May be used to adjust the degrees of freedom for the averaged tests of significance. Corrected tests are displayed in the Tests of Within-Subjects Effects table.

TABLA 11: RESULTADOS DE LA VARIACIÓN ENTRE GRUPOS DEL *REPEATED MEASURES* ANOVA DE LOS DATOS DEL HPC DEL EXPERIMENTO 2. COMO GRUPOS A COMPARAR: BASAL, SB70 Y AS19.

Tests of Within-Subjects Effects

Measure: MEASURE_1

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared	Nonce nt. Parameter	Observed Power ^a
factor 1	Sphericity Assumed	1274.827	2	637.414	8.575	.017	.741	17.149	.813
	Greenhouse-Geisser	1274.827	1.061	1201.032	8.575	.056	.741	9.101	.540
	Huynh-Feldt	1274.827	1.158	1100.435	8.575	.050	.741	9.933	.577
	Lower-bound	1274.827	1.000	1274.827	8.575	.061	.741	8.575	.515
	Sphericity Assumed	446.029	6	74.338					

Error factor 1)	Greenhouse-Geisser	446.029	3.184	140.070				
	Huynh-Feldt	446.029	3.475	128.338				
	Lower-bound	446.029	3.000	148.676				

a. Computed using alpha = .05

TABLA 12: RESULTADOS DEL TEST DE BONFERRONI DEL *REPEATED MEASURES* ANOVA DE LOS DATOS DEL HPC DEL EXPERIMENTO 2. COMO GRUPOS A COMPARAR: BASAL, SB70 Y AS19.

Pairwise Comparisons

Measure: MEASURE_1

(I) factor1	(J) factor1	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	3.149	3.715	1.000	-14.895	21.193
	3	23.268	8.448	.211	-17.759	64.296
2	1	-3.149	3.715	1.000	-21.193	14.895
	3	20.119	5.132	.089	-4.807	45.045
3	1	-23.268	8.448	.211	-64.296	17.759
	2	-20.119	5.132	.089	-45.045	4.807

Based on estimated marginal means

a. Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

11.2.2. CPF

TABLA 13: RESULTADOS DE *REPEATED MEASURES* ANOVA DE LOS DATOS DEL PFC DEL EXPERIMENTO 2. COMO GRUPOS A COMPARAR: BASAL, DRUG1 Y DRUG2.

Effect	Value	Multivariate Tests ^a			Sig.	Partial Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power ^c	
		F	Hypothesis df	Error df					
factor 1	Pillai's Trace	.640	1.779 ^b	2.000	2.000	.360	.640	3.558	.131
	Wilks' Lambda	.360	1.779 ^b	2.000	2.000	.360	.640	3.558	.131

Hotelling's Trace	1.779	1.779 ^b	2.000	2.000	.360	.640	3.558	.131
Roy's Largest Root	1.779	1.779 ^b	2.000	2.000	.360	.640	3.558	.131

- a. Design: Intercept
Within Subjects Design: factor1
- b. Exact statistic
- c. Computed using alpha = .05

11.3. ANEXO 3: TABLAS ESTADÍSTICAS PARA EL EXPERIMENTO 3

11.3.1. HPC

TABLA 14: RESULTADOS DE *REPEATED MEASURES ANOVA* DE LOS DATOS DEL HPC DEL EXPERIMENTO 3. COMO GRUPOS A COMPARAR: BASAL, DRUG1 Y DRUG2.

		Multivariate Tests ^a							
Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.	Partial Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power ^c
factor1	Pillai's Trace	.542	1.184 ^b	2.000	2.000	.458	.542	2.369	.105
	Wilks' Lambda	.458	1.184 ^b	2.000	2.000	.458	.542	2.369	.105
	Hotelling's Trace	1.184	1.184 ^b	2.000	2.000	.458	.542	2.369	.105
	Roy's Largest Root	1.184	1.184 ^b	2.000	2.000	.458	.542	2.369	.105

- a. Design: Intercept
Within Subjects Design: factor1
- b. Exact statistic
- c. Computed using alpha = .05

11.3.2. CPF**TABLA 15:** RESULTADOS DE *REPEATED MEASURES ANOVA* DE LOS DATOS DEL CPF DEL EXPERIMENTO 3. COMO GRUPOS A COMPARAR: BASAL, DRUG1 Y DRUG2.

		Multivariate Tests ^a							
Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.	Partial Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power ^c
factor1	Pillai's Trace	.740	2.850 ^b	2.000	2.000	.260	.740	5.700	.176
	Wilks' Lambda	.260	2.850 ^b	2.000	2.000	.260	.740	5.700	.176
	Hotelling's Trace	2.850	2.850 ^b	2.000	2.000	.260	.740	5.700	.176
	Roy's Largest Root	2.850	2.850 ^b	2.000	2.000	.260	.740	5.700	.176

a. Design: Intercept

Within Subjects Design: factor1

b. Exact statistic

c. Computed using alpha = .05