



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE PSICOLOGÍA

TESIS

**Caracterización de las vías serotoninérgicas  
en el cerebro de *Octopus maya***

***PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE  
LICENCIATURA EN PSICOLOGÍA***

***PRESENTA***

**Paulette García Andaluz**  
paulette.andaluz@gmail.com  
Nº cuenta 415012331  
4433605444

Director de Tesis  
**Dr. Hugo Sánchez Castillo**

Revisor de Tesis  
**Dr. José Fernando Peña Ortega**

Sínodo  
**Dr. Fructuoso Ayala Guerrero**  
**Dr. Octavio César García González**  
**Dr. Claudio Gómez**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*Para Porter*

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias al Dr. Lenin David Ochoa de la Paz y a S. Daniela Rodríguez Montaña por su aportación crucial en el proceso histológico de este estudio. Al Dr. Hugo por darme la oportunidad y las vías para ser una sandía redonda y no una cuadrada. Gracias especiales a Susana y Leonardo por mostrarme cómo sí se hace, en tantos aspectos. Por supuesto a Diana, Pau, Ken, las Marianas, Noe y Yahel, por ser una red de apoyo modalidad navaja suiza. Inmensas gracias a la Dra. Olga y al Dr. Curiel por aconsejarme y ayudarme extensamente durante 6 años consecutivos. A mis padres por el perfeccionismo y la obsesividad heredada. Gracias a Gustavo por mantenerme viva durante la carrera; y a Mercedes, Jena y la Negrita por mantenerme viva desde el 2009. Gracias infinitas a Gaby, Mai y Rodrigo por el hogar, la incondicionalidad y el cariño interminable, todo es recíproco. De manera subrayada, gracias a Pavela simplemente por ser. Y sobre todo, gracias al equipo de los pulpos por la comprensión y paciencia inmensa a pesar de mi acumulación de taches. Gracias Fabián y Alex, por la inspiración diaria, por el apoyo multi-canal todo terreno y por dejarme vivir y compartir un sueño con ustedes.

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b>	<b>4</b>
<b>GLOSARIO DE ABREVIATURAS</b>	<b>6</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>8</b>
<b>1. SEROTONINA</b>	<b>9</b>
1.1. 5-HT	9
Figura 1. Biosíntesis de la Serotonina.	10
Figura 2. Sinapsis Serotoninérgica.	11
1.2. RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS	11
Figura 3. Familias y subfamilias de receptores serotoninérgicos.	12
Tabla 1. Efectos celulares de las distintas familias de receptores serotoninérgicos.	13
1.2.1 RECEPTOR 5-HT <sub>1A</sub>	14
1.3. NEURONATOMÍA FUNCIONAL	15
Figura 4. Mapa del sistema serotoninérgico en humanos.	17
1.3.1. FUNCIÓN DE LA SEROTONINA EN MAMÍFEROS	17
1.3.1.1. Función De 5-HT <sub>r</sub> En Mamíferos	19
Tabla 2. Zonas de mayor expresión y función de receptores serotoninérgicos en mamíferos.	20
1.3.2. FUNCIÓN DE LA SEROTONINA EN INVERTEBRADOS	21
<b>2. PULPOS</b>	<b>25</b>
Figura 5. Caricatura de <i>Octopus maya</i>	25
2.1. MODELO DE CONDUCTA COMPLEJA	27
2.2. NEUROANATOMÍA FUNCIONAL DE PULPOS	30
Figura 6. Esquema de cerebro de <i>O. maya</i> adulto	32
2.2.1. REGIÓN SUBESOFÁGICA	33
2.2.2. REGIÓN SUPRAESOFÁGICA	33
Tabla 3. Estructuras del Cerebro de Pulpo y su función asociada.	38
2.3. SEROTONINA EN PULPOS	39
2.4. <i>OCTOPUS MAYA</i>	40
Figura 7. <i>Octopus maya</i>	41
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>42</b>
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>42</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>44</b>
5.1. OBJETIVO GENERAL	44

5.2. OBJETIVO PARTICULAR	45
<b>6. HIPÓTESIS</b>	<b>45</b>
6.1. HIPÓTESIS GENERAL	45
<b>7. MÉTODO</b>	<b>45</b>
7.1. SUJETOS	45
7.2. MATERIALES	45
Tabla 4. Anticuerpos primarios y secundario	46
7.3. PROCEDIMIENTO	46
7.4. ANÁLISIS DE DATOS	47
<b>8. RESULTADOS</b>	<b>48</b>
8.1. INMUNOFLUORESCENCIA TIPO 5-HT	48
Figura 8. Localización de Inmunofluorescencia tipo 5-HT.	48
Figura 9. Cuantificación de InFl tipo 5-HT en el cerebro de <i>O. maya</i>	49
8.2. INMUNOFLUORESCENCIA TIPO 5-HT1A	49
Figura 10. Localización de Inmunofluorescencia tipo 5-HT1A.	50
Figura 11. Cuantificación de InFl tipo 5-HT1A en el cerebro de <i>O. maya</i> .	51
8.3. INMUNOFLUORESCENCIA TIPO 5-HT Y 5-HT1A	51
Figura 12. Presencia de InFl tipo 5-HT y 5-HT1A en las estructuras del cerebro de <i>O. maya</i> .	52
<b>9. DISCUSIÓN</b>	<b>52</b>
9.1. INMUNOFLUORESCENCIA TIPO 5-HT EN EL CEREBRO DE <i>O. MAYA</i>	52
Tabla 5. Localización de inmunofluorescencia tipo 5-HT y 5-HT1A en las estructuras del cerebro de <i>O. maya</i> .	54
9.2. INMUNOFLUORESCENCIA TIPO 5-HT1A EN EL CEREBRO DE <i>O. MAYA</i>	54
9.3. PROYECCIONES	58
<b>10. CONCLUSIONES</b>	<b>59</b>
<b>11. REFERENCIAS</b>	<b>61</b>
<b>12. ANEXOS</b>	<b>73</b>
Anexo 1. Obtención del tejido	73
Anexo 2. Protocolo de Inmunomarcaje	73
Anexo 3. Imágenes de los grupos 5-HT	76
Anexo 4. Imágenes de los grupos 5-HT1A	77
Anexo 5. Intensidad de Brillo y Coeficiente de Fluorescencia tipo 5-HT y 5-HT1A	79

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina o 5-hidroxitriptamina
5-HTP	5-Hidroxitriptófano
5-HTr	Receptor selectivo de serotonina
AC	Adenilato ciclasa
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
BaA	Lóbulo Basal Anterior
BaD	Lóbulo Basal Dorsal
BaL	Lóbulo Basal Lateral
BaM	Lóbulo Basal Medial
Bu	Lóbulo Bucal
ChA	Lóbulo Cromatóforo Anterior
ChP	Lóbulo Cromatóforo Posterior
EC	Células enterocromafines
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G
HPLC	Cromatografía de alta presión
IF	Lóbulo Inferior Frontal
InFl	Inmunofluorescencia
ir-5-HT	Inmunoreactividad a 5-HT
LO	Lóbulo Óptico
LV	Lóbulo Vertical
MAO	Enzima monoamina oxidasa
Mg	Lóbulo Magnocelular
NAD	Dinucleótido de nicotinamida (oxidado)
NADH	Dinucleótido de nicotinamida (reducido)
NR	Núcleos del rafé
Olf	Lóbulo Olfatorio

Ped	Lóbulo Peduncular
PeA	Lóbulo Pedal Anterior
PeL	Lóbulo Pedal Lateral
PeP	Lóbulo Pedal Posterior
PKC	Proteína Quinasa C
PL	Fosfolipasa
PBu	Lóbulo Posterior Bucal
PosBra	Lóbulo Posbraquial
PreBra	Lóbulo Prebraquial
Prec	Lóbulo Precomisural
PV	Lóbulo Paleovisceral
SERT	Transportadores de serotonina
SF	Lóbulo Superior Frontal
Sif	Lóbulo Sifón
SNC	Sistema nervioso central
SubPed	Lóbulo Subpeduncular
SubF	Lóbulo Subfrontal
SubV	Lóbulo Subvertical
TGI	Tracto gastrointestinal
Trp	Triptófano
Vas	Lóbulo Vasomotor
VTA	Área ventral tegmental



## RESUMEN

La 5-hidroxitriptamina (5-HT) o serotonina, es un neurotransmisor altamente conservado en el reino animal, cuyo estudio ha sido considerado crucial para comprender los mecanismos fisiológicos subyacentes a la conducta y la cognición. Particularmente, la investigación en especies fisiológicamente distantes a los mamíferos como los invertebrados, ha contribuido fuertemente a la perspectiva general del papel de la 5-HT y ha presentado una oportunidad para estudiar el desarrollo evolutivo de sistemas nerviosos complejos y la emergencia de la cognición. Sin embargo, a pesar de haberse identificado la presencia de 5-HT en el cerebro de pulpos, organismos fisiológicamente capacitados para ser un buen modelo de cognición, su mecanismo de acción en estos animales aún no ha sido descrito. Por lo tanto, en este estudio se evaluó la presencia y distribución de la 5-HT y del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en el cerebro de la especie de pulpo *Octopus maya*. A partir de una técnica de inmunomarcaje, se observó inmunofluorescencia tipo 5-HT y 5-HT<sub>1A</sub> en los lóbulos Óptico, Olfatorio, Vertical, Subvertical, Superior Frontal, Inferior Frontal, Subfrontal, Posterior Bucal, Bucal, Basal Anterior, Precomisural, Basal Medial, Basal Dorsal, Paliovisceral, Pedal Posterior, Pedal Anterior, Posbraquial y Prebraquial; además de inmunofluorescencia tipo 5-HT<sub>1A</sub> en los lóbulos Cromatóforo Posterior, Vasomotores, Sifón y en el Nervio Braquial. Estos resultados indican una posible participación conservada de la 5-HT en la integración de información, aprendizaje, memoria, regeneración axonal, modulación inhibitoria de otros neurotransmisores y regulación homeostática de organismos tanto vertebrados como algunos invertebrados. De esta manera, aquí se presenta la primera evidencia directa de la presencia de un receptor serotoninérgico y un posible mecanismo subyacente a la plasticidad sináptica en el sistema nervioso de los octópodos.

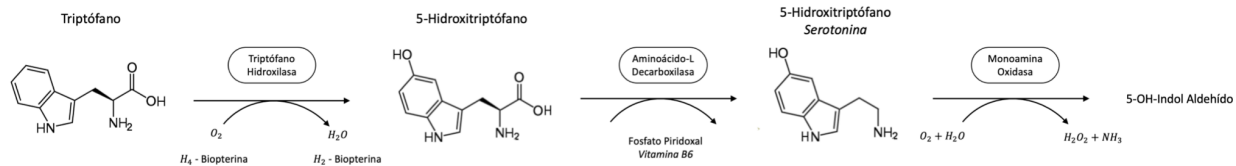
## 1. SEROTONINA

### 1.1. 5-HT

La 5-hidroxitriptamina (5-HT) o serotonina, es una monoamina filogenéticamente antigua cuya presencia data de hace más de 700 millones de años, antecediendo la aparición de plantas y por supuesto neuronas. Está altamente conservada en una gran variedad de especies actuales de los reinos protista, fungi, plantae y animalia, en los que participa en varios procesos biológicos a través de la señalización celular (Azmitia, 2020; Nichols, 2014).

Su biosíntesis a partir del aminoácido esencial hidrofóbico Triptófano (Trp) se realiza en dos pasos en la mayoría de los organismos (*Figura 1*), donde la enzima triptófano hidroxilasa utiliza oxígeno para convertir el Trp en el precursor 5-Hidroxitriptófano (5-HTP), que posteriormente es descarboxilado para producir 5-HT. Éste proceso predata a los linajes modernos de bacterias y es observable en los sistemas unicelulares de las cianobacterias, algas y hongos, donde el Trp en rodopsinas y clorofila le permite a las proteínas captar luz y que la energía solar sea utilizada para su metabolismo a través de la producción de NADH, NAD y  $O_2$  (Azmitia, 2020; Kuhn, & Hasegawa, 2020).

Por lo anterior, se considera que la capacidad de algunas células de producir grandes cantidades de  $O_2$  a través del Trp pudo llevar a la producción de serotonina (Azmitia, 2020). Consecuentemente, la amenaza de daño oxidativo por las especies reactivas de oxígeno, propició el desarrollo de maquinaria adecuada para su reducción, como lo fueron las enzimas hidroxilasas primitivas; y a su vez la producción de agentes antioxidantes celulares como la 5-HT. Esta postura permite explicar que los niveles de 5-HT en una planta son 100 veces mayores a aquellos encontrados en el cerebro de un animal (Azmitia, 2020), donde el Trp es sumamente limitado. Aún más, los cofactores necesarios para la biosíntesis de 5-HT, como la biopterina, fosfato piridoxal y la previamente mencionada NADH, también son derivados del Trp, lo que respalda su mecanismo autosuficiente en organismos unicelulares antiguos. Por otro lado, la degradación de la 5-HT por la enzima monoamina oxidasa (MAO) deriva en la producción de metabolitos como la melatonina (*Figura 1*), otro agente altamente antioxidante presente en casi cualquier organismo vivo; o la auxina, el factor trófico más importante en plantas (Nichols, 2014; Azmitia, 2020).

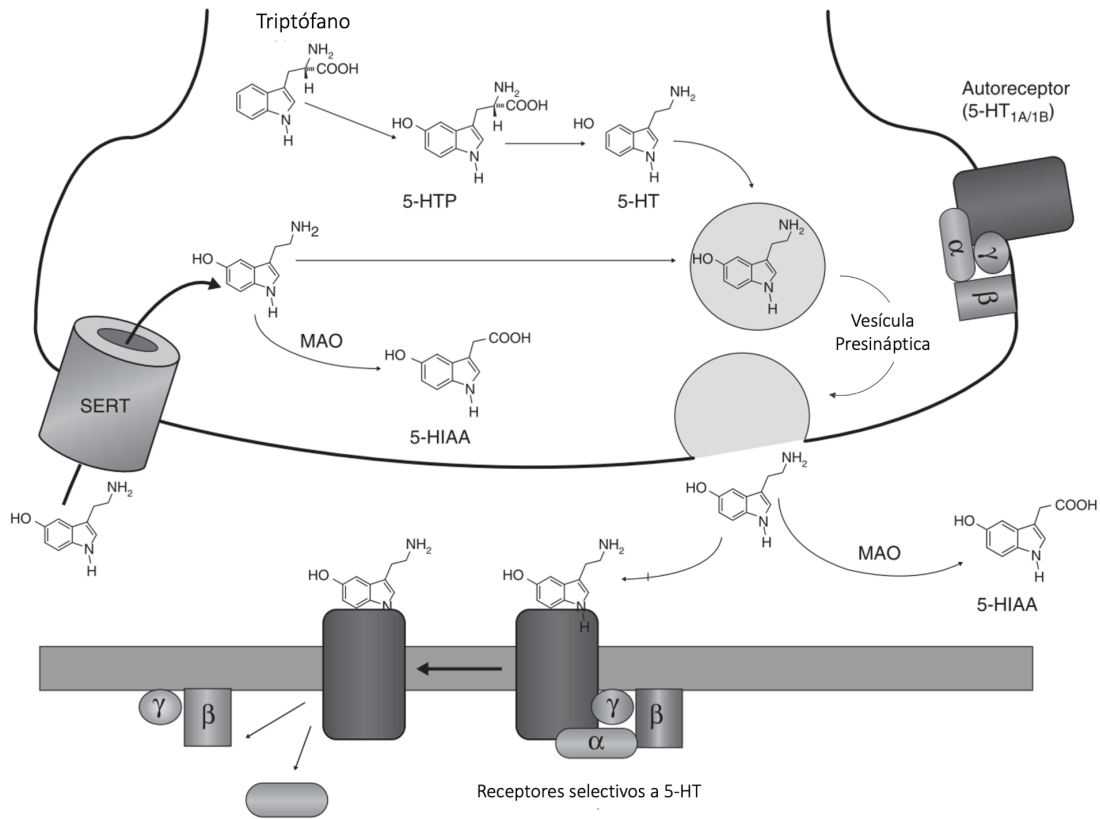


*Figura 1. Biosíntesis de la Serotonina.*

La enzima triptófano hidroxilasa utiliza oxígeno y biopterina para convertir el Triptófano en el precursor 5-Hidroxitriptófano, que posteriormente es descarboxilado para producir 5-HT utilizando los cofactores, fosfato piridoxal y NADH. Su degradación es llevada a cabo por la enzima monoamina oxidasa (MAO) y deriva en la producción de metabolitos como la melatonina. (Adaptado de Kumar & Kishore, 2020).

Dada la amplia presencia de la 5-HT en organismos vivos diversos entre sí, sus efectos también varían enormemente entre los reinos. Sin embargo, debido a que la mayoría de los estudios se han realizado a partir de modelos animales, la 5-HT es comúnmente conocida como neurotransmisor y neurohormona. Bajo este análisis, se le ha postulado como mensajero químico endógeno en la comunicación neuronal, expresado específicamente en algunas células epiteliales, adipocitos y en células nerviosas, y que facilita las funciones controladas por el sistema nervioso en el organismo (Azmitia, 2020; Jones, Sun, Martin, & Keating, 2020).

En las neuronas serotoninérgicas del sistema nervioso, la 5-HT es almacenada en vesículas presinápticas dentro de la neurona, que la protegen de la degradación intra y extracelular, y la prepara para ser liberada (Kumar, Abed, Bataineh, & Salem, 2020; Athar, 2010). Durante la sinapsis, la 5-HT actúa sobre receptores selectivos a serotonina (5-HT<sub>r</sub>) en la membrana de las células postsinápticas influenciando en su estado de polarización; y su actividad es finalizada por su recaptura en la terminal presináptica a través de los transportadores de serotonina (SERT), moléculas dependientes de energía específicamente localizadas en las neuronas serotoninérgicas (Figura 2) (Pettigrew, Smolen, Baxter, & Byrne, 2005; Nichols, 2014).

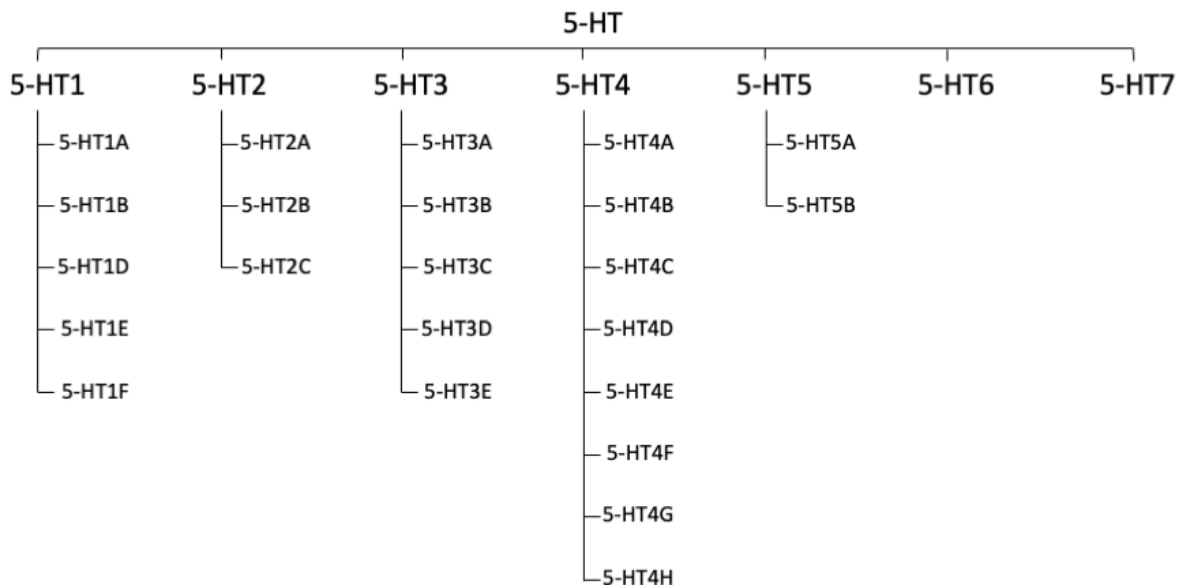


*Figura 2. Sinapsis Serotoninérgica.*

*Dentro de la neurona serotoninérgica presináptica, la 5-HT es empaquetada en vesículas sinápticas que ante un potencial de acción se fusionan con la membrana y liberan su contenido al espacio sináptico. Ahí, la 5-HT se puede unir y activar a receptores selectivos a 5-HT (5-HT<sub>r</sub>). La 5-HT sobrante en la sinapsis es degradada por la enzima monoamina oxidasa (MAO) o retomada por los transportadores de serotonina (SERT) en la terminal presináptica. (Adaptado de Nichols, 2014).*

## 1.2. RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS

Actualmente se sabe que la 5-HT actúa en su blanco a través de una variedad de receptores específicos (5-HT<sub>r</sub>), de los cuales se conocen al menos 16 subtipos (*Figura 3*) que han sido clasificados en 7 familias de receptores a partir de su composición molecular y características estructurales, transduccionales y farmacológicas (Cortes-Altamirano et al., 2018; Kumar, & Kishore, 2020; Di Giovanni, Chagraoui, Bharatiya, & De Deurwaerdère, 2020).



*Figura 3. Familias y subfamilias de receptores serotoninérgicos.*

*Las familias de receptores 5-HT1, 5-HT2 y 5-HT4-7 están compuestas por receptores acoplados a proteínas G y la familia 5-HT3 por receptores iónicos. De entre estas familias de receptores, los 5-HT1 y 5-HT5 tienen un efecto inhibitorio en la postsinapsis; mientras que los 5-HT2, 5-HT3, 5-HT4 y 5-HT6-7 tienen un efecto excitatorio. (Adaptado de Kumar & Kishore, 2020).*

Las familias de receptores 5-HT1, 5-HT2 y 5-HT4-7 están compuestas por receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), una clase de receptor cuya familia es una de las más grandes en los eucariontes y que está constituida por genes considerados entre los más exitosos en los organismos vivos debido a su vasta dispersión entre los phyla (Moutkine, Collins, Béchade, & Maroteaux, 2019). Se considera que los GPCRs serotoninérgicos regulan canales iónicos específicos para cada subtipo, alterando la excitabilidad de la célula en donde son expresados a través de su vía de señalización independiente (Di Giovanni, Chagraoui, Bharatiya, & De Deurwaerdère, 2020). De manera más específica, la actividad de estas familias de receptores está directamente relacionada con la regulación de la actividad de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^{+}$  y de la adenilato ciclasa (AC), impactando consecuentemente en los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) intracelular mediante el acoplamiento preferencial a proteínas del subtipo  $G_{\alpha i/o}$  y  $G_s$ . En su última instancia, son capaces de alterar la transcripción génica en el núcleo de la

neurona mediante la actividad de cinasas (Pettigrew, Smolen, Baxter, & Byrne, 2005; Nichols, 2014).

Los receptores 5-HT1 se asocian generalmente a la inhibición de la AC a través de la activación de canales de  $K^+$  e inhibición de canales de  $Ca^{2+}$  (Kumar, & Kishore, 2020; Hensler, 2012). Los 5-HT2 detonan a fosfolipasas (IP3) y promueven la descarga de ácido araquidónico y liberación de  $Ca^{2+}$  almacenado en el citoplasma (*Tabla 1*). De estas familias, los receptores 5-HT1A y 5-HT2A presentan respuestas opuestas a la 5-HT, uno siendo inhibitorio y el otro excitatorio respectivamente, lo que permite evidenciar la flexibilidad del sistema serotoninérgico (Carhart-Harris, & Nutt, 2017; Kumar, & Kishore, 2020).

Los 5-HT5 también inhiben la AC al igual que los 5-HT1 (*Tabla 1*). En contraste, los receptores 5-HT4, 6 y 7 activan a la AC que aumentan los niveles intracelulares de cAMP y detona la actividad de cinasas. Aunado a esto, los 5-HT6 se caracterizan por regular a otros neurotransmisores como dopamina, acetilcolina, GABA y la misma 5-HT debido a su presencia en regiones características por liberar estos neurotransmisores en mamíferos (Kumar, & Kishore, 2020; Andrade, & Haj-Dahmane, 2020).

Familia	Tipo	Mecanismo	Efecto
5-HT1	Acoplado a proteína $G_{ai/o}$	Activación de Canales de $K^+$ ; Inhibición de Canales de $Ca^{2+}$	$\downarrow$ AC Inhibitorio
5-HT2	Acoplado a proteína $G/q_{11}$	$\uparrow PL_{A,C,\beta}$	$\uparrow Ca^{2+}$ intracelular; Activación de PKC y Rho Excitatorio
5-HT3	Canal iónico de $Na^+$ y $K^+$	Despolarización	Excitatorio
5-HT4	Acoplado a proteína $G_s$	$\uparrow$ AC	$\uparrow$ AMPc Excitatorio
5-HT5	Acoplado a proteína $G_{ai/o}$	Activación de Canales de $K^+$ ; Inhibición de Canales de $Ca^{2+}$	$\downarrow$ AC Inhibitorio
5-HT6	Acoplado a proteína $G_s$	$\uparrow$ AC	$\uparrow$ AMPc Excitatorio
5-HT7	Acoplado a proteína $G_s$	$\uparrow$ AC	$\uparrow$ AMPc Excitatorio

*Tabla 1. Efectos celulares de las distintas familias de receptores serotoninérgicos.*

AC: Adenilato Ciclasa; PL: Fosfolipasa; PKC: Proteína Quinasa C; AMPc: Adenosín Monofosfato Cíclico. (Adaptado de Kumar & Kishore, 2020).

Por otro lado, la 5-HT también actúa en receptores ionotrópicos como lo son aquellos pertenecientes a la familia 5-HT3, caracterizados por ejecutar potenciales postsinápticos rápidos mediante la unión del ligando a canales iónicos no específicos que

permiten la entrada de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y la salida de  $\text{K}^+$  (Azmitia, 2020; Andrade, & Haj-Dahmane, 2020; Kumar, & Kishore, 2020) (*Tabla 1*). Ésta familia de receptores se diversificó aproximadamente en el periodo en el que los vertebrados divergieron de los invertebrados. (Moutkine, Collins, Béchade, & Maroteaux, 2019). Estos se encuentran tanto en la pre- como post-sinapsis y su activación puede regular la liberación de otros neurotransmisores como dopamina, acetilcolina, GABA y sustancia P (Kumar, & Kishore, 2020).

La mayoría de estos receptores son postsinápticos, a excepción de algunos de la familia 5-HT<sub>1</sub> que son presinápticos y modulan la liberación de serotonina (Athar, 2010; Nichols, 2014). Por otro lado, una misma neurona puede co-expresar varios tipos de 5-HT<sub>r</sub> además de receptores a otros neurotransmisores, permitiendo que la 5-HT interactúe con mecanismos de acción distintos. De esta manera, el efecto de la 5-HT dependerá de la combinación específica de receptores presentes en la neurona postsináptica (Meunier et al., 2017; Di Giovanni, Chagraoui, Bharatiya, & De Deurwaerdère, 2020). Aún más, no solo la 5-HT se acopla a los 5-HT<sub>r</sub>, sino que muchos de los metabolitos del triptófano y de la 5-HT misma también actúan a través de estos receptores para ejercer su efecto sobre el organismo (Azmitia, 2020). Esta diversidad y flexibilidad inherente del sistema serotoninérgico indica un posible papel de la 5-HT en la adaptación del organismo a su entorno a través de respuestas distintas mediadas por un mismo sistema (Andrade, & Haj-Dahmane, 2020; Carhart-Harris, & Nutt, 2017).

### *1.2.1 RECEPTOR 5-HT<sub>1A</sub>*

Como fue mencionado, los GPCRs no solo son uno de los tipos de receptores más preservados y exitosos, sino que también de los más antiguos en los organismos vivos. Particularmente las rodopsinas, que cumplen una de las funciones más primitivas de cualquier receptor: la captación de luz. Además de utilizar Trp, las rodopsinas tienen una homología significativa con el receptor 5-HT<sub>1A</sub>, compartiendo la mayoría de su estructura (Nowak, Kolaczowski, Pawlowski, & Bojarski, 2006; Moutkine, Collins, Béchade, & Maroteaux, 2019). Así, se considera que esta familia de 5-HT<sub>r</sub> evolucionó hace alrededor de 800 millones, antes que los receptores muscarínicos, dopaminérgicos y adrenérgicos (Peroutka & Howell, 1994). Aún más, si se considera a las rodopsinas como el prototipo

del receptor 5-HT<sub>1A</sub>, entonces la emergencia de los 5-HT<sub>r</sub> sucedió entre hace 3.5 y 2.5 mil millones de años en cianobacterias, por lo que es posible encontrarlo en cualquier especie animal (Cummings, Canseco, Sheth, Johnson, & Schetz, 2010; Azmitia, 2020).

El mecanismo de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> es disminuir los niveles de AC y cAMP al acoplarse a una proteína  $G_{ai/o}$  y desencadenar vías de transducción de señales a través de cinasas. Se encuentran generalmente en neuronas serotoninérgicas, fungiendo como autorreceptores somatodendríticos que inhiben la actividad serotoninérgica (Kumar, & Kishore, 2020; Nichols, 2014). De esta manera, son componentes clave en la actividad serotoninérgica ya que están a cargo de la modulación a partir de su retroalimentación negativa. Por otro lado, también es posible encontrarlos en áreas postsinápticas de inervación serotoninérgica, donde provocan la apertura de canales de K<sup>+</sup> y la inhibición de la actividad de la AC, lo que resulta en la hiperpolarización neuronal y lo ha posicionado como receptor inhibitorio (Hensler, 2012; Carhart-Harris, & Nutt, 2017; Kumar, & Kishore, 2020; Nichols, 2014).

### 1.3. NEURONATOMÍA FUNCIONAL

Después de 60 años de investigación dedicada al estudio de la 5-HT utilizando técnicas de localización, evaluación electrofisiológica y manipulación a través de fármacos selectivos para los 5-HT<sub>r</sub>, se ha podido identificar que la 5-HT participa en una gran cantidad de procesos fisiológicos y conductuales en los animales, desde la vasoconstricción, recepción sensorial, motricidad y apetito (Azmitia, 2020), hasta memoria, sueño, agresión, conducta sexual y social (Zarindast, Nasehi & Hoseinpoufard, 2014; Carhart-Harris, & Nutt, 2017; Muma & Kapadia, 2020; Cassel, 2020; Marin et al., 2020). Pero ¿Qué papel desarrolla ésta en cada uno de ellos?

La vía y componentes esenciales para la biosíntesis de 5-HT y sus mecanismos de acción están altamente conservados en el reino animal (Di Giovanni, et al., 2020; Azmitia, 2020; Alavi, Nagasawa, Takahashi, & Osada, 2017). Sin embargo, dada su amplia presencia, no es sorprendente que la estructura del sistema serotoninérgico, las características de las neuronas serotoninérgicas y la interacción que tienen con el resto del sistema varía significativamente entre los taxa (Lillesaar & Gaspar, 2018; Vleugels, Verlinden, Vanden Broeck, 2015; Alavi, Nagasawa, Takahashi, & Osada, 2017). Aún así,



existen algunos principios organizacionales que se consideran generalizados, como la característica divergente del sistema, en la que un grupo reducido de neuronas serotoninérgicas proyecta ampliamente a una gran cantidad de cuerpos celulares en todo el sistema. Dada esta característica, se apoya la noción de que la 5-HT actúa más como modulador que como transmisor, cuyo efecto dura minutos más que segundos. Otro aspecto generalizable es que no todas las células que contienen 5-HT tienen la capacidad de sintetizarla, sino que la almacenan. Aún más, tanto en vertebrados como invertebrados, el sistema serotoninérgico es sumamente plástico y maleable, capaz de cambiar a lo largo del desarrollo y de producir especializaciones funcionales de las neuronas serotoninérgicas, que dependen de su fisiología, localización en el sistema nervioso, conectividad y co-expresión de neurotransmisores (Lillesaar & Gaspar, 2018)

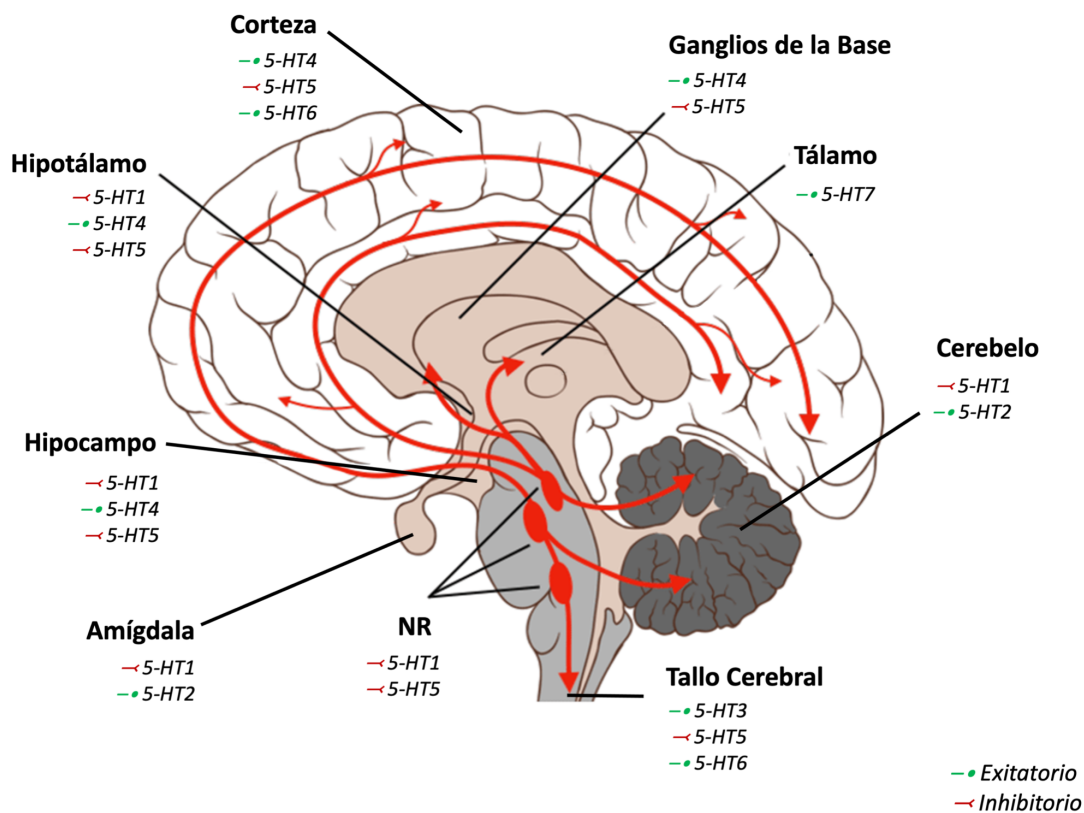


Figura 4. Mapa del sistema serotoninérgico en humanos.

Estructuras principales a las que proyectan las neuronas serotoninérgicas de los Núcleos del Rafe y los receptores que éstas expresan. NR: Núcleos del Rafe. (Adaptado de Nummenmaa, L., Seppälä, K., & Putkinen, V., 2020).

Dado que los efectos de la 5-HT no solo dependen del tipo de receptor con el que interactúe, sino también de la distribución de las neuronas serotoninérgicas y sus receptores (*Figura 4*), las técnicas de localización se proponen como una estrategia importante para comprenderlos (Di Giovanni et al., 2020; Nichols, 2014). De esta manera, para identificar el papel de la 5-HT en los procesos conductuales es necesario explicar cómo cierto 5-HT<sub>r</sub> modula una región o núcleo específico del cerebro involucrada en producir la respuesta conductual (Berger, Gray, & Roth, 2009).

### *1.3.1. FUNCIÓN DE LA SEROTONINA EN MAMÍFEROS*

A pesar de ser una molécula altamente conservada, la mayoría de los estudios realizados para comprender la función de la 5-HT se han realizado en animales con centros neuronales altamente organizados, particularmente en mamíferos donde la 5-HT participa en virtualmente todos los procesos fisiológicos (Azmitia, 2020). Entre el 90% y 95% de toda la 5-HT en estos organismos es sintetizada en las células enterocromafines (EC) del tracto gastrointestinal (TGI) a través de la enzima triptófano hidroxilasa en su isoforma uno TPH1. El triptófano en estas células les permite sentir y responder a estímulos luminosos de la microbiota y sus metabolitos, para regular la movilidad gastrointestinal y controlar la homeostasis de glucosa del organismo. La 5-HT derivada de las EC es una amina pleiotrópica involucrada en varias funciones en la periferia, como la regulación de la densidad ósea, regeneración del hígado, agregación plaquetaria e inflamación. El resto de la 5-HT en la periferia se produce en los adipocitos, islotes pancreáticos y glándulas mamarias, donde participa, entre otras funciones, en la vasoconstricción (Martin, Young, Leong, Rogers, Spence, Jessup, & Keating, 2017; Jones, Sun, Martin, & Keating, 2020; Athar, S., 2010).

Dado que el Trp no es producido naturalmente en los animales y que la barrera hematoencefálica no permite el paso de la 5-HT en la sangre hacia el cerebro, se necesita un mecanismo independiente de distribución al sistema nervioso central (SNC). Éste utiliza proteínas de unión a Trp en plasma y células gliales en el SNC para su recepción y transporte. Aunado a esto, las neuronas serotoninérgicas del SNC desarrollaron axones largos no mielinizados que absorben Trp y sintetizan 5-HT mediante la TPH2, su propia isoforma de la enzima triptófano hidroxilasa. Así, la biosíntesis de 5-HT en el cerebro es

limitada ya que depende de la cantidad de Trp que logre cruzar la barrera hematoencefálica, por lo cual la organización eficiente de las neuronas serotoninérgicas es crucial para su efectividad como neurotransmisor (Athar, S., 2010; Azmitia, 2020).

En el cerebro de los mamíferos, una cantidad relativamente pequeña de neuronas localizadas en el tallo cerebral inerva prácticamente a todo el cerebro. Las neuronas serotoninérgicas están localizadas exclusivamente en los núcleos del rafé (NR), donde reciben información aferente de la médula espinal y proyectan sus ramificaciones axonales a la mayoría del prosencéfalo administrando toda la serotonina del cerebro (Azmitia, 2020; Hensler, 2012; Cortes-Altamirano et al., 2018; Commons, 2020; Cohen & Grossman, 2020; Athar, 2010). A pesar de que la localización discreta de las neuronas serotoninérgicas en el cerebro no es única, ya que la comparte con el sistema noradrenérgico, es una característica importante del sistema serotoninérgico mamífero, pues implica que la 5-HT ejerce una amplia función regulatoria en los circuitos neuronales centrales (Andrade, & Haj-Dahmane, 2020; Cohen & Grossman, 2020).

En primates, las neuronas serotoninérgicas están organizadas en 9 grupos nombrados del B1 al B9 distribuidos diferencialmente en la región dorsal y medial de los NR. Las neuronas serotoninérgicas de estas dos regiones no solo difieren en sus proyecciones axonales, sino también en sus características electrofisiológicas, inhibición por autoreceptores y morfología. La región dorsal proyecta sus axones delgados con varicosidades pequeñas y pleomórficas (tipo D) al cerebelo y al tallo cerebral (*Figura 4*), ejerciendo una influencia inhibitoria o facilitadora en el procesamiento de información nociceptiva. En contraste, la región medial proyecta de manera ascendente con axones gruesos y varicosidades esféricas (tipo M) hacia la corteza, regiones prefrontales, parietales y occipitales, corteza cingulada, hipocampo, mesencéfalo, y tálamo (Cortes-Altamirano et al., 2018; Hensler, 2012) (*Figura 4*). A su vez, los NR también reciben información aferente del hipotálamo, corteza y amígdala, así como de algunas estructuras del tallo cerebral como la sustancia negra, el área ventral tegmental (VTA, actividad dopaminérgica), el núcleo vestibular superior (acetilcolina), locus coeruleus (norepinefrina) y núcleo hipogloso y del tracto solitario (epinefrina) (Hensler, 2012).

### 1.3.1.1. Función De 5-HT<sub>1</sub> En Mamíferos

La presencia y capacidad de modulación de la 5-HT en el cerebro de los primates es casi generalizada (Nichols, 2014). Sin embargo, la diversidad y especificidad de la señalización serotoninérgica surge a partir de los receptores en los que actúa en las regiones finales (*Tabla 2*) (Hensler, 2012).

La actividad de los receptores 5-HT<sub>1</sub> ha sido asociada con procesos fisiológicos como la producción de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), la regulación de funciones cardiovasculares, el ritmo cardiaco, presión arterial, dilatación de la pupila y vasoconstricción (Hensler, 2012; Kumar, & Kishore, 2020). Está presente en altas densidades en estructuras corticales y límbicas como amígdala, además de en el hipocampo, corteza entorrinal, septum lateral y en NR (Nichols, 2014), donde abren canales de K<sup>+</sup> en la región dorsal pero no inhiben a la AC. Esto sugiere que este subtipo de receptor tiene un papel en la cognición, en funciones integrativas y en estados emocionales, lo que concuerda con su involucramiento en la ansiedad, agresión, adicción y apetito (Hensler, 2012). De manera más particular, este receptor se ha considerado necesario para la evocación de la memoria y la adquisición de memorias de miedo a largo plazo en ratas (Pavlova & Rysakova, 2018). Por otro lado, en los humanos estos receptores están en sus niveles más altos antes de nacer (Azmitia, 2020), lo que indica que podrían estar involucrados en la diferenciación celular y neurodesarrollo.

Los receptores de la familia 5-HT<sub>2</sub> tienen distribuciones regionales diferentes en el cerebro por lo que cada subtipo es capaz de mediar funciones fisiológicas particulares y distintas entre sí. En el músculo liso vascular tiene un efecto vasoconstrictor, mientras que en el músculo esquelético es vasodilatador (Moutkine, Collins, Béchade, & Maroteaux, 2019). Los 5-HT<sub>3</sub> están presentes en su mayoría en el tallo cerebral, particularmente en el núcleo del tracto solitario y postrema, estructuras que están asociadas al vómito. También están presentes en el TGI donde controlan su motilidad, secreción y peristalsis. Congruentemente, su actividad se ha visto involucrada en las náuseas durante la radio y quimioterapia. La familia 5-HT<sub>4</sub> se encuentran en el septum, hipocampo, corteza prefrontal y ganglios de la base, por lo que se les asocia con la neurotransmisión de acetilcolina, glutamato y GABA dado que son regiones con altas concentraciones en estos neurotransmisores (Kumar, & Kishore, 2020). De la familia 5-HT<sub>5</sub>, se han observado

receptores en la corteza cerebral, hipocampo, septum, hipotálamo, ganglios de la base, amígdala, pallidum ventral, corteza entorrinal y cingulada, NR y espina dorsal. Aunque su activación se ha asociado a la regulación de la ingesta de comida y la respiración, su función no ha sido identificada aún (Hensler, 2012; Kumar, & Kishore, 2020; Vilaró, Cortés, Mengod, & Hoyer, 2020). Los receptores de la familia 5-HT<sub>6</sub> se encuentran predominantemente en regiones límbicas y extrapiramidales, lo que sugiere que son importantes para el control motor y la cognición. De acuerdo con esto, se han observado asociados a procesos de memoria y aprendizaje además de ansiedad y epilepsia. Y por último, los 5-HT<sub>7</sub> en el hipotálamo se han visto involucrados en la regulación de la temperatura corporal, los ritmos circadianos y el sueño MOR (Kumar, & Kishore, 2020).

Familia	Zona	Función/Participación en el Organismo
5-HT1	Amígdala Hipocampo Corteza Entorrinal Septum Lateral NR Cerebelo	Producción de ACTH Regulación ritmo cardíaco, presión arterial, dilatación de la pupila y vasoconstricción Integración de Información Participa en ansiedad, agresión, adicción, apetito Participa diferenciación celular y neurodesarrollo
5-HT2	Músculo liso Músculo esquelético	Vasoconstrictor Vasodilatador
5-HT3	Núcleo del tracto solitario TGI	Regulación de motilidad, secreción y peristalsis del TGI Participa en vómito, náuseas
5-HT4	Septum Hipocampo Corteza Prefrontal Ganglios de la Base	Modulación de neurotransmisión de acetilcolina, glutamato y GABA
5-HT5	Corteza cerebral Estrcutras límbicas NR Medula Espinal	Regulación de la ingesta de comida Participa en respiración
5-HT6	Corteza Cerebral Estrcutras límbicas Estríado Corteza Piriforme Bulbo Olfatorio Medula Espinal	Control motor Participa en memoria y aprendizaje, ansiedad, epilepsia
5-HT7	Hipotálamo Tálamo	Regulación de la temperatura corporal, ritmos circadianos y sueño MOR

Tabla 2. Zonas de mayor expresión y función de receptores serotoninérgicos en mamíferos.  
NR: Núcleos del Rafé; ACTH: Hormona Adrenocorticotropa; TGI: Tracto Gastrointestinal.

Lo anterior no solo demuestra que los estudios de localización son útiles para comprender el funcionamiento de la 5-HT en los organismos, sino que también demuestra que la organización morfológica del sistema serotoninérgico evoluciona continuamente para proveer distribución más precisa en el cerebro (Azmitia, 2020). Así, las neuronas serotoninérgicas mapean funcionalmente el cerebro y su amplia distribución y diversidad inherente permite explicar su participación en tantas de las conductas de un organismo. Aún más, se ha postulado recientemente que su influencia en la actividad general del cerebro podría radicar en modular el tiempo que antecede a una conducta o proceso fisiológico al facilitar las respuestas motoras y suprimiendo la actividad sensorial irrelevante para la conducta en curso (Hensler, 2012). En otras palabras, en regular el cambio de la conducta a través del tiempo (Commons, 2020) y en consecuencia, cómo el organismo interactúa con el mundo exterior (Azmitia, 2020).

### 1.3.2. FUNCIÓN DE LA SEROTONINA EN INVERTEBRADOS

Además de la especificidad en información que ha otorgado el estudio de la 5-HT en mamíferos, grandes avances se realizaron a partir de estudios efectuados en invertebrados dada la simplicidad de su sistema nervioso. Algunos modelos experimentales animales han sido extremadamente valiosos para el estudio de la 5-HT, cada uno aportando información relevante (Lillesaar & Gaspar, 2018).

En *Drosophila melanogaster*, el Trp es hidrolizado por dos tipos de enzima diferenciadas por su ubicación en el sistema nervioso y la periferia, muy similar a como sucede en mamíferos. En contraste, parece que la monoamina oxidasa no es expresada en insectos, por lo que se considera que la desaminación se realiza a partir del marcaje de la terminación-amino mediante N-acetilación, N-metilación,  $\gamma$ -glutamilación, sulfatación o conjugación de  $\beta$ -alanilo (Vleugels, Verlinden, Vanden Broeck, 2015). Las neuronas serotoninérgicas de su sistema nervioso son mayormente interneuronas aglomeradas, bilaterales y simétricas con proyecciones locales, lo cual permite una modulación sobre circuitos específicos, participando en el sueño, aprendizaje, memoria, agresión, y cortejo de estos organismos. Los 5-HT<sub>r</sub> que se han identificado en esta especie son los 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> y 5-HT<sub>7</sub>, que como en todas las especies, exhiben distintos patrones de expresión entre sí. Mediante éstos, la 5-HT en la periferia actúa sobre las glándulas salivales regulando la secreción de saliva; en los músculos e intestinos

provocando la contracción y relajación, teniendo efectos antidiuréticos; y controla el desarrollo al afectar la secreción de péptidos tipo-insulina que regulan el azúcar en sangre y por consiguiente el crecimiento y apetito (Lillesaar & Gaspar, 2018; Vleugels, Verlinden, Vanden Broeck, 2015; Nichols, 2014).

En otros artrópodos como *Procambarus clarkii*, donde las neuronas serotoninérgicas también son interneuronas, la 5-HT regula conductas sociales como posturas dominantes, golpeteo de cola y respuestas de escape (Azmitia, 2020) a través de la facilitación o inhibición de la actividad de las neuronas gigantes laterales (Nichols, 2014). Las abejas presentan una cantidad alta de receptor 5-HT1 en sus sistema nervioso, el cual ha sido asociado al procesamiento de información visual. En otros insectos, el receptor 5-HT7 está altamente presente en las glándulas salivales, regulando la producción de saliva a través del aumento de AMPc intracelular (Lillesaar & Gaspar, 2018; Nichols, 2014; Azmitia, 2020). Por otro lado, en los insectos con sistemas nerviosos más simples, la 5-HT actúa como molécula de mecanismo de defensa o como neurotransmisor en neuronas sensoriales (Vleugels, Verlinden, Vanden Broeck, 2015).

*Aplysia californica* es uno de los modelos más importantes por su aportación a las bases moleculares y celulares del aprendizaje y la memoria. Su sistema serotoninérgico es tan sencillo e identificable que ha sido posible asociar algunos de sus circuitos con conductas específicas y explicar el mecanismo completo de acción inter e intracelular (Lillesaar & Gaspar, 2018). Durante el desarrollo de su sistema nervioso, el ganglio apical (GA) consta de 5 neuronas que modulan la tasa de disparos de las células procesadores de información sensorial y motora de la postsinapsis en la periferia, el corazón, el TGI y las gónadas (Azmitia, 2020). En los adultos de esta especie el sistema nervioso está conformado por los ganglios bucal, cerebral, pleural, pedal y abdominal, de entre los cuales hay presencia de neuronas serotoninérgicas en las cortezas o pericarion de tres de ellos. El cerebral contiene una neurona gigante serotoninérgica en la parte anterior que regula el alertamiento y la conducta de alimentación, además de un conglomerado de neuronas serotoninérgicas en la parte posterior. La población más grande de neuronas serotoninérgicas está en el ganglio pedal donde se expresa el receptor 5-HTap1 que se sugiere que actúa como autoreceptor. Por último, en el ganglio abdominal también se encuentran varios grupos de neuronas serotoninérgicas, algunas de ellas con forma

estrellada. Su distribución entre el ganglio cerebral y pedal es simétrica, mientras que en el ganglio abdominal es simétrica entre los hemiganglios. La innervación de estos cuerpos celulares se extiende por todos los ganglios, en los que actúa a través de los receptores 5-HTap1, 5-HTap2 y 5-HTapAC1, similares a los receptores de la familia 5-HT1 y 5-HT2 en vertebrados (Lillesaar & Gaspar, 2018).

En otros moluscos como los bivalvos, cuya expresión de 5-HT es mayor que la de cualquier otro invertebrado, la desactivación de la 5-HT también se lleva a cabo a través de la MAO, pero mayormente a través de la recaptura presináptica (Alavi, Nagasawa, Takahashi, & Osada, 2017; Vleugels, Verlinden, Vanden Broeck, 2015). En esta clase de animales, las neuronas serotoninérgicas son mayormente unipolares y de distintos tamaños con vesículas granulares. Su organización es aglomerada con localización principal en la corteza o pericarion de los ganglios del sistema nervioso y gónadas. Su localización en estas dos regiones y ausencia en la hemolinfa, nos indican su papel como neurotransmisor y regulador del sistema reproductivo endocrino, lo cual se ha visto comprobado a partir de su participación en la maduración de oocitos y la movilidad espermática (Alavi, Nagasawa, Takahashi, & Osada, 2017).

En *Caenorhabditis elegans*, de las 302 neuronas del adulto, 11 son serotoninérgicas, las cuales son heteromórficas, sintetizadoras además de otros neurotransmisores y funcionan como quimiosensores, neurosecretoras, interneuronas y neuronas motoras que permiten la alternancia rápida de circuitos quimiosensoriales involucrados en quimio-sensación, alimentación, puesta de huevos en hembras y conducta sexual en machos. Expresa receptores tipo 5-HT1, 5-HT2, 5-HT6 y 5-HT7, además de un 5-HT<sub>r</sub> ligado a canales de  $Cl^-$  que no es expresado en otras especies (MOD-1). Ambos sexos presentan los mismos conjuntos de neuronas serotoninérgicas en la parte anterior de la faringe, en cambio en el cuerpo medio y cola presentan diferencias específicas de cada sexo, lo que refleja las diferencias conductuales de estos animales (Lillesaar & Gaspar, 2018; Nichols, 2014; Azmitia, 2020).

Al igual que el resto de la literatura sobre 5-HT, la caracterización de los 5-HT<sub>r</sub> también se obtuvo a través de la investigación en modelos animales mamíferos. A pesar de lo anterior, todos los receptores serotoninérgicos clonados hasta ahora muestran homología con los receptores serotoninérgicos mamíferos. Particularmente, los receptores 5-HT1 y



5-HT<sub>7</sub> inhiben y estimulan la producción de cAMP respectivamente, al igual que los receptores vertebrados homólogos (Azmitia, 2020; Marin., Bécamel, Chaumont-Dubel, Vandermoere, Bockaert, & Claeysen, 2020). Aún más, la participación del receptor 5-HT<sub>1</sub> en procesamiento de información, aprendizaje y memoria; la participación del receptor 5-HT<sub>7</sub> en la regulación de la actividad del músculo visceral; y la participación de ambos en la regeneración axonal, parecen ser funciones conservadas entre vertebrados e invertebrados (Vleugels, Verlinden, Vanden Broeck, 2015; Sobrido-Camean, Celina Rodicio, & Barreiro-Iglesias, 2018). Lo anterior concuerda con la noción de que el receptor 5-HT<sub>1</sub> evolucionó antes que los demás y que su aparición en los organismos sucede en períodos ontogénicos tempranos (Azmitia, 2020). Por otro lado, el receptor 5-HT<sub>3</sub> no ha sido observado en ninguna especie de invertebrados, además se considera que los distintos subtipos de 5-HT<sub>r</sub> de cada familia evolucionaron independientemente en vertebrados e invertebrados (Marin et al., 2020).

Dado que los invertebrados conforman alrededor del 95% del reino animal, las lecciones acerca del sistema serotoninérgico en este grupo de animales se vuelven altamente relevantes y su variabilidad denota la capacidad de flexibilidad y adaptabilidad del sistema. A partir de la comparación entre resultados obtenidos de los estudios en estos animales y los mamíferos, ha sido posible identificar que conforme los centros neuronales se complejizan para responder a las demandas del ambiente, las neuronas serotoninérgicas disminuyen su tamaño relativo, aumentan en cantidad y se posicionan de manera que su organización les permite actuar en conglomerado y su localización interactuar extensivamente con los centros organizacionales (Kandel & Schwartz, 1982; Kristan & Nusbaum, 1982; Marois & Carew, 1997; Azmitia, 2020). En este último tipo de sistema nervioso, se considera que la 5-HT tiene un papel crítico en la cognición al fungir como moduladora de la excitabilidad de las redes neurobiológicas mediante los mecanismos opuestos y superpuestos de su gran abanico de receptores (Di Giovanni, Chagraoui, Bharatiya, & De Deurwaerdère, 2020). Sin embargo, aún queda mucho por investigar del sistema serotoninérgico de los invertebrados, ya que poco se sabe de su función en sistemas nerviosos más complejos como el de los cefalópodos, lo cuales han sido repetidamente utilizados en modelos de memoria y aprendizaje y que podrían aportar nuevos correlatos

neurobiológicos de la cognición como lo ha hecho *A. californica* y *Lymnaea stagnalis* (Baxter, Cataldo, & Byrne, 2013).

## 2. PULPOS

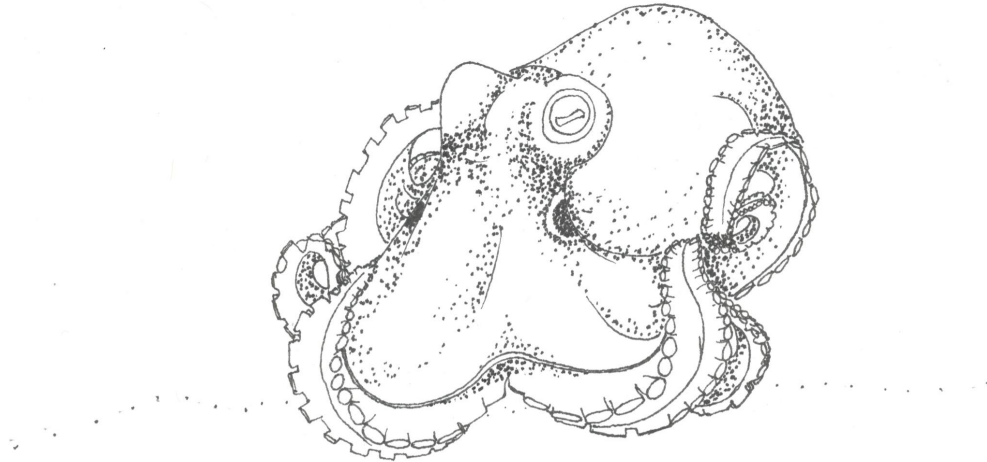


Figura 5. Caricatura de *Octopus maya*

Los pulpos (Figura 5) son cefalópodos coleoides, una subclase de animales perteneciente al *phylum Mollusca* conformado por decápodos (calamares y sepias), octópodos (pulpos) y vampiromorfos. Éstos representan la mayoría de los cefalópodos, siendo los nautiloideos la única otra subclase existente dentro de este grupo de organismos filogenéticamente antiguos (O'Brien, Ponte, & Fiorito, 2019). Evolucionaron hace 380 millones de años, alrededor del tiempo en el que los teleósteos aparecieron (Roper, Sweeney, & Nauen, 1984), y han cambiando drásticamente desde entonces, diferenciándose de los nautilus y otros moluscos en su hábitat, morfología y comportamiento (Hochner, Shomrat & Fiorito 2006; Wang, Ragsdale, Wang, & Ragsdale, 2019). Perdieron el caparazón heredado de sus ancestros moluscos, lo que propició su dispersión a casi cualquier ecosistema marino y su especialización como depredadores. El manto se convirtió en un órgano locomotor que provee alta movilidad a través de la propulsión en jet, su sistema circulatorio se convirtió en cerrado y el pie molusco fué reemplazado por múltiples brazos o tentáculos sumamente flexibles y eficientes (Wang & Ragsdale, 2019; O'Brien, Ponte, & Fiorito, 2019). Se desarrolló un saco de tinta dentro del manto, toxinas salivares

para la inmovilización de presas y un pico firme para triturarlas (Grasso & Basil, 2009). Aún más, se propició el desarrollo del sistema nervioso más complejo de entre los invertebrados que subyace a capacidades sensoriales y cognitivas análogas a las de los vertebrados, como su sistema visual y vestibular, y algunas incluso únicas, que le permiten a estos organismos alterar su apariencia para camuflajearse y comunicarse (Hochner, Shomrat, & Fiorito, 2006; Tanner et al, 2017; Bertapelle, Polese, Di Cosmo, 2017). Dadas las condiciones de competencia en las cuales los coleoides evolucionaron, estos animales ejemplifican cómo las presiones evolutivas pueden producir gran complejidad en organismos con limitaciones biológicas y morfológicas (O'Brien, Ponte, & Fiorito, 2019).

Particularmente, los pulpos pertenecen a la familia octopodidae, conformada por más de 300 especies estrictamente marinas y sumamente diversas. Entre ellas hay tanto especies pigmeas que pesan apenas unos gramos como especies gigantes de 40 kg (O'Brien, Ponte, & Fiorito, 2019; Mather & Kuba, 2018), tanto solitarias como aquellas que viven en pequeñas densidades; y de aguas someras como profundas. Son cazadores generalistas y oportunistas de una gran variedad de organismos (Maselli, Al-Soudy, Buglione, Aria, Polese, & Di Cosmo, 2020) y la mayoría son bentónicos aunque también los hay pelágicos. Tienen una vida relativamente corta entre 6 meses y 4 años dependiendo de la especie, alcanzando su madurez y su muerte después de reproducirse. Su desarrollo está dividido en etapas de maduración clasificadas como: embrión, paralarva u holobentónico, juvenil, subadulto y adulto, que difieren entre sí en su morfología, conducta y hábitat en el que suceden (Mather & Kuba, 2018; Schnell & Clayton, 2019; O'Brien, Ponte, & Fiorito, 2019; Wollesen, Sukhsangchan, Seixas, Nabhitabhata, & Wanninger, 2012).

La diversidad entre las distintas especies de pulpo evidencia las modificaciones radicales que sufrieron los pulpos para adaptarse a la vida en el bentos; mientras que las diferentes etapas en la vida del organismo indican la presencia de un sistema plástico capaz de identificar las presiones ambientales cambiantes para producir la respuesta adecuada (Di Cosmo, Maselli, & Polese, 2018). En efecto, los pulpos desarrollaron un sistema visual complejo y estructuras oculares análogas a las de los vertebrados, un sistema vestibular, un análogo a la línea lateral de los peces, un sistema de audición primitivo de mecanorrecepción por células ciliares, además de quimio y fotorreceptores en la piel y un

órgano olfatorio (Mather & Kuba, 2018; Bertapelle, Polese, Di Cosmo, 2017; Katz Shomrat, & Neshet, 2021). Los organismos de la familia octopodidae tienen ocho brazos ausentes de huesos, modulados por musculatura hidrostática, mediante los cuales ejecutan una gran cantidad de movimientos. Con ellos exploran, se trasladan, se limpian a sí mismos; cazan, capturan presas y las transfieren a la boca; se protegen de depredadores e intercambian gametos (O'Brien, Ponte, & Fiorito, 2019; Wang & Ragsdale, 2019). Cada uno de ellos cuenta con dos hileras de ventosas desde la base hasta la punta capaces de sujetar y manipular objetos, al igual que sensor información quimiotáctil. A lo largo de toda la piel de estos organismos hay una alta concentración de cromatóforos, leucóforos y papilae, que permiten cambios rápidos en coloración y textura del organismo, generando una amplia variedad de patrones cromáticos (Hallon, Messenger, 2018). Estas estructuras en conjunto proveen a los pulpos de un refinamiento motriz característico, capacidad postural y libertad de apariencia (Hochner, 2013; Bertapelle, Polese, Di Cosmo, 2017; Mather & Kuba, 2018; Grasso & Basil, 2009; Di Cosmo, Maselli, & Polese, 2018).

### 2.1. MODELO DE CONDUCTA COMPLEJA

De manera independiente a las otras subclases de cefalópodos, los octópodos desarrollaron un sistema nervioso más complejo que incluso el de algunos vertebrados; que junto con su anatomía única, su capacidad de neurogénesis adulta y edición de ARN, les permiten desplegar un amplio y sofisticado abanico conductual (Alves, C., Boal, J. G., & Dickel, L., 2008; Hochner, 2013; Di Cosmo, Maselli, & Polese, 2018; Bertapelle, Polese, Di Cosmo, 2017; O'Brien, Ponte, & Fiorito, 2019). Estos animales son catalogados como cazadores generalistas solitarios, lo que concuerda con su conducta exploratoria caracterizada por atender a objetos novedosos (Resultados no publicados obtenidos en el Laboratorio de Neuropsicofarmacología de la UNAM), utilizando señales visuales para optimizar su actividad de forrajeo y localizar su guarida en ambientes desconocidos (Boal, Dunham, Williams, & Hanlon, 2000; Vitti, 2013), por lo que se considera que tienen habilidades de navegación y de memoria sofisticadas.

Uno de los factores más impresionantes de los octópodos y los cefalópodos en general, es su capacidad de camuflajearse en términos de color y textura con el ambiente que los rodea. Se ha identificado que los patrones cromáticos que producen son tanto

identificadores individuales como especie-específicos, y aún así existen algunos que coinciden entre las especies fungiendo como despliegues conductuales anti-depredadores y de apareamiento (Huffard, 2007; Mather & Kuba, 2018; Josef & Shashar, 2019; Schnell & Clayton, 2021). Ésta comunicación flexible y dependiente de la experiencia en los cefalópodos implica integración visual compleja, toma de decisiones y cierta capacidad de autopercepción, lo que propone el estudio del camuflaje de los cefalópodos como una nueva aproximación para estudiar cognición avanzada e incluso consciencia animal (Mather & Dickel, 2017; Kuba, Gutnick, & Burghardt, 2019; Birch, Schnell, & Clayton, 2020). De acuerdo con esta propiedad flexible de su conducta, están los estudios enfocados en la clasificación de posturas, conductas y patrones de actividad a través de la observación tanto en su ambiente natural (Mather & Alupay, 2016; Kuba, Gutnick, & Burghardt, 2019) como en cautiverio (Wells & Young, 1969; González-Navarrete, 2021), a partir de los cuales se considera que son capaces de adaptar su apariencia y actividad a las demandas del ambiente, como la presencia de depredadores y conespecíficos (Amodio & Fiorito, 2013; Meisel, Kuba, Byrne, & Mather, 2013).

Consecuentemente, la conducta y capacidades cognitivas de los pulpos han sido evaluadas por décadas en condiciones experimentales, donde han demostrado tener capacidad de discriminación visual y táctil, incluyendo orientación de objetos (Wells & Young, 1969; Anderson, Mather, Monette, & Zimsen, 2010; Tricarico, Borrelli, Gherardi, & Fiorito, 2011; Amodio & Fiorito, 2013; Huffard, 2013; Mather & Kuba, 2018; O'Brien, Ponte, & Fiorito, 2019) y discriminación condicionada utilizando objetos tanto reales como virtuales (Prank, Wilson, & Harcourt, 2010), sensibilización de la conducta de ataque y habituación a nuevos contextos e individuos (Kawashima, Takei, Yoshikawa, & Yasumuro, 2020; Dan, Shibasaki, Takasugi, et al., 2021). A través de la implementación de paradigmas de aprendizaje asociativo, se ha evidenciado su capacidad de resolución de problemas (Mather & Dickel, 2017; Borrelli, Chiandetti, & Fiorito, 2020) y formas de aprendizaje más complejo como condicionamiento operante (Huffard, 2013; Kawashima et al., 2020), aprendizaje espacial (Hochner et al., 2006) y de transferencia y posiblemente planeación (Mather & Kuba, 2018; Mather & Dickel, 2017). Por otro lado, a pesar de no ser un animal social, algunas especies de pulpos parecen presentar una forma de aprendizaje vicario duradero (O'Brien, Ponte, & Fiorito, 2019; Borrelli, Chiandetti, & Fiorito, 2020) y

aprendizaje de rangos sociales, además de uso de herramientas (Hochner, Shomrat & Fiorito, 2006; Kuba, Gutnick, & Burghardt, 2014; Huffard et al. 2010; Zarrella, Ponte, Baldascino, & Fiorito, 2015; Schnell & Clayton, 2019; Kuba, Gutnick, & Burghardt, 2019; Borrelli, Chiandetti & Fiorito, 2020; Birch, Schnell, & Clayton, 2020; Schnell & Clayton, 2021). Aún más, en los últimos años, se ha sugerido que los octópodos podrían estar sujetos a estados emocionales dada su capacidad de juego, la cual ha sido asociada a emociones positivas en otros animales (Kuba, Meisel, Byrne, Griebel, & Mather, 2003; Kuba, Gutnick, & Burghardt, 2014); y su capacidad de experimentar dolor a través de activación de neuronas sensoras respondientes a estímulos nocivos acompañados de sensibilización nociceptiva, conductas de autoprotección y posiblemente componentes afectivos negativos (Alupay, Hadjisolomou, & Crook, 2014; Butler-Struben, Brophy, Johnson, & Crook, 2018).

Considerando lo anterior y la capacidad de los pulpos de aclimatación a condiciones experimentales (Dan, Shibasaki, Takasugi, et al., 2021), su tendencia a explorar objetos novedosos (Resultados no publicados obtenidos en el Laboratorio de Neuropsicofarmacología de la UNAM) y resiliencia a operaciones invasivas y a anestesia (Hochner et al., 2006; O'Brien, Ponte, & Fiorito, 2019), éstos han sido postulados como un buen modelo de conducta y cognición (Borrelli, Chiandetti & Fiorito, 2020; Kuba, Gutnick, & Burghardt, 2014; Hochner, Shomrat & Fiorito, 2006; Amodio & Fiorito, 2013; Borrelli, Chiandetti, & Fiorito, 2020 Schnell & Clayton, 2019). Así, en el 2015 se les incluyó en la regulación de animales experimentales de investigación en la Unión Europea por la Directive 2010/63/EU, y su uso ha incrementado en los últimos años (Young, 1971; Mather, 2008; Di Cristina, Andrews, Ponte, Galligioni, & Fiorito, 2015), principalmente en el campo de las neurociencias, donde la investigación ha sobrepasado la curiosidad inicial convirtiendo a los pulpos en un modelo importante para la resolución de problemas y proposición de nuevas perspectivas sobre la cognición de invertebrados. Este modelo no solo provee una posibilidad para identificar el origen de rasgos cognitivos comúnmente estudiados en la psicología comparada, sino que ha reforzado la comprensión de la evolución de la cognición ( Wells & Young, 1969; Huffard, 2007; Vidal, 2014; Mather & Alupay, 2016; Schnell & Clayton, 2021). Sin embargo, a pesar de todos los avances mencionados acerca del aprendizaje en los octópodos, se conoce muy poco acerca de cómo se codifica, almacena, evoca y consolida la información en estos organismos, por lo que las

particularidades conductuales y mecanismos biológicos de la memoria en pulpos aún quedan por ser estudiados (Mather, 2008).

## 2.2. NEUROANATOMÍA FUNCIONAL DE PULPOS

El gran repertorio conductual de los pulpos está asociado a la organización de su sistema nervioso, su encefalización y alta jerarquización. Éste está compuesto por un cerebro de 40 a 45 millones de células, unas estructuras ópticas con alrededor de 180 millones y un anillo de ganglios interbraquiales y sus nervios axiles que juntos contienen dos tercios del total de 500 millones de neuronas del sistema, por lo que se le considera un sistema nervioso semicentralizado (Hochner, 2012). Los lóbulos que lo conforman tienen una organización característica de gastrópodos, de manera que los cuerpos celulares delimitan su periferia formando una corteza de varias capas de pericaria, mientras que los axones constituyen el neuropilo denso e interconectan un lóbulo con otro (Young, 1963; Grasso & Basil, 2009; Hochner, 2012; O'Brien, Ponte, & Fiorito, 2019; Hochner, Shomrat & Fiorito, 2006; Ibrahim, 2020).

Una de las entradas de información sensorial al organismo es a través del sistema nervioso de los brazos, el cual está compuesto por alrededor de 350 millones de células. Cada brazo está inervado por un nervio axial que lo recorre desde la base hasta la punta, proyecta con sus axones hacia los músculos de manera lateral, y proporciona un ganglio y células sensoriales primarias a cada una de las ventosas a lo largo de la estructura. Los circuitos de estos ganglios permiten la generación de movimientos finos en las ventosas y el procesamiento de información sensorial multimodal (O'Brien, Ponte, & Fiorito, 2019). (Wang & Ragsdale, 2019). En la base de los brazos cerca de la boca, el Cordón del Nervio Axial forma la comisura interbraquial, un anillo de ganglios que interconectan los nervios de cada uno de los brazos entre sí (Bellier, Xie, Farouk., Sakaue, Tooyama, & Kimura, 2017). Dada esta compleja organización descentralizada, se considera que los brazos tienen cierto nivel de autonomía para ejecutar no solo respuestas reflejas, sino también de interactuar con el ambiente apesar de estar separado del cerebro (Bellier, Xie, Farouk., Sakaue, Tooyama, & Kimura, 2017; Katz, Shomrat, & Nesher, 2021). Sin embargo, posterior a este anillo, existe un flujo de información aferente y eferente entre los brazos y el cerebro a través del tracto cerebrobraquial. Este tracto proyecta 8 Nervios Braquiales

directamente a la región anterior subesofágica del cerebro, desde donde la información es transmitida a estructuras de alto procesamiento para posteriormente emitir una respuesta motora adecuada (Wang & Ragsdale, 2019; Resultados similares han sido obtenidos por nuestro grupo de trabajo).

El cerebro de los pulpos tiene un tamaño relativo al cuerpo más pequeño que el de aves y mamíferos pero mayor que el de peces o reptiles (Hochner, Shomrat & Fiorito, 2006; Grasso & Basil, 2009; Bertapelle, Polese, Di Cosmo, 2017; Di Cosmo, Maselli, & Polese, 2018; O'Brien, Ponte, & Fiorito, 2019; Ibrahim, 2020). Su forma toroide rodea el esófago a partir del cual se divide en región supra y subesofágica compuestas de 40 lóbulos heterogéneos. (Young, 1963; Grasso & Basil, 2009; Hochner, 2012; O'Brien, Ponte, & Fiorito, 2019; Hochner, Shomrat & Fiorito, 2006; Ibrahim, 2020). En su mayoría, están compuestos por neuronas unipolares de proyecciones cortas y neuronas pequeñas que actúan como interneuronas y se comunican a través de una variedad de posibles neurotransmisores. Por otro lado, las cortezas también están conformadas por células gliales de entre las cuales componen la barrera hemoencefálica. (Hochner, 2012; Ibrahim, 2020).

Los lóbulos del cerebro (*Figura 6*) están organizados en grupos funcionales que procesan información sensorial a través de matrices distribuidas en el cerebro. La región subesofágica que contiene los centros motores basales e intermedios, regula la homeostasis del animal e integra información sensorial antes de enviarla a centros de procesamiento avanzado en la región supraesofágica (*Figura 6*). En ésta están los centros motores avanzados y los centros de procesos de aprendizaje de alto orden donde la información de varias fuentes es integrada para producir respuestas apropiadas (Young, 1963; O'Brien, Ponte, & Fiorito, 2019).



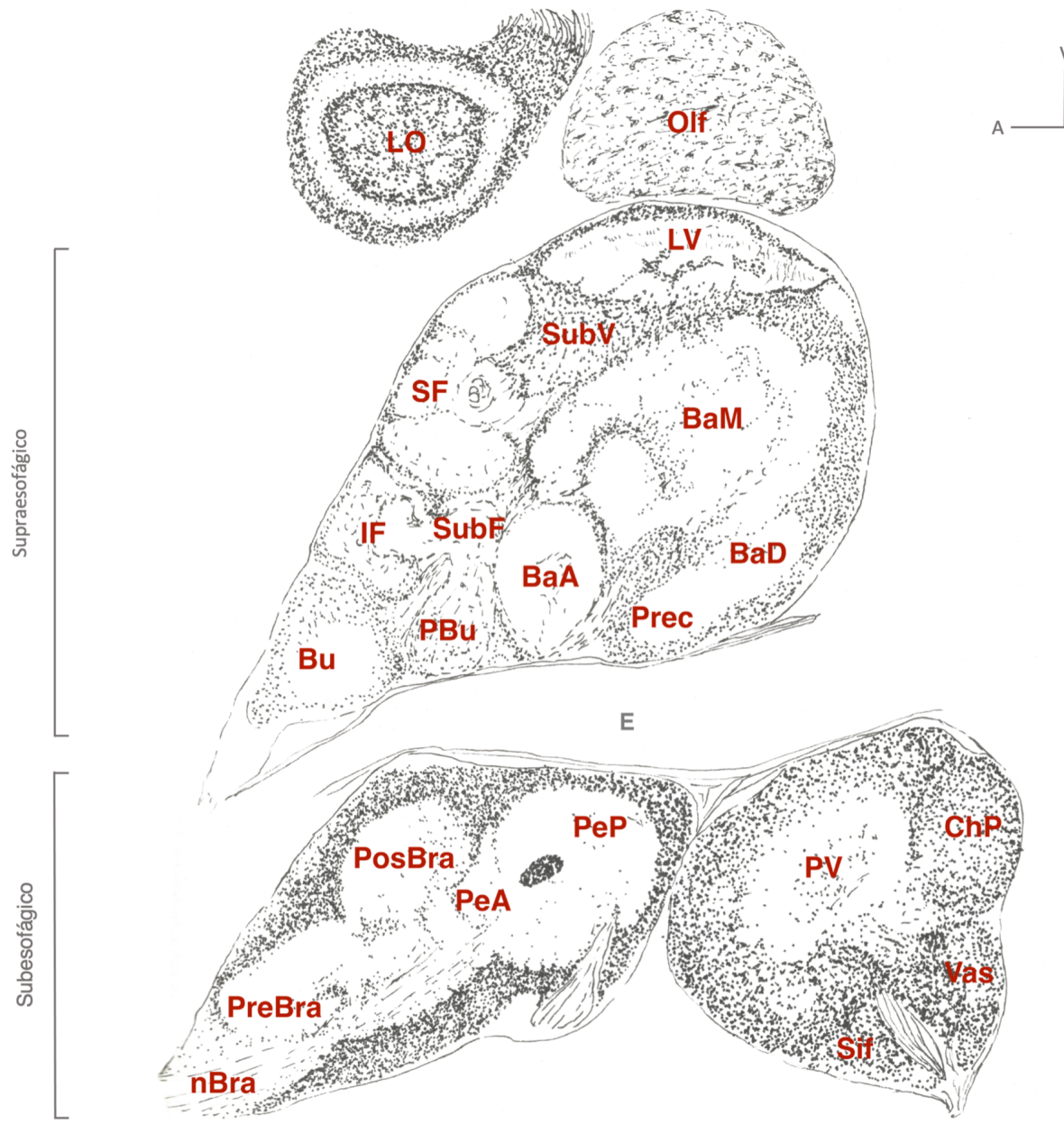


Figura 6. Esquema de cerebro de *O. maya* adulto

Corte sagital medial del cerebro de *O. maya* adulto indicando algunos de los lóbulos; LO: Óptico, Olf: Olfatorio, LV: Vertical, SubV: Subvertical, SF: Superior Frontal, IF: Inferior Frontal, SubF: Subfrontal, Bu: Bucal, PBu: Posterior Bucal, BaA: Basal Anterior, Prec: Precomisural, BaD: Basal Dorsal, BaM: Basal Medial, E: Esófago, ChP: Cromatóforo Posterior, Vas: Vasomotor, Sif: Sifón, PV: Paleovisceral, PeP: Pedal Posterior, PeA: Pedal Anterior, PosBra: Posbraquial, PreBra: Prebraquial, nBra: Nervio Braquial.

### 2.2.1. REGIÓN SUBESOFÁGICA

En la parte más anterior de esta región se encuentra el lóbulo Braquial (Bra), dividido en la sección pre-braquial (PreBra) y post-braquial (PosBra) que codifican información quimiotáctil de los brazos y el movimiento individual de cada uno de ellos. Dada la presencia de células grandes en la sección post-braquial, se le ha asociado al control motor de las partes más distales de los brazos (Young, 1963). En la sección medial se encuentra el lóbulo Pedal Anterior (PeA) asociado al movimiento de los brazos en conjunto ya que proyecta a músculos en la base de los brazos y a la membrana interbraquial. Se encuentra también el Pedal Posterior (PeP) que controla al sifón y la retracción de la cabeza; y sus circuitos han sido identificados como el mecanismo de dirección durante el nado. A los lados están los lóbulos Cromatóforos Anteriores (ChA) y detrás los Pedales Laterales (PeL), regiones de intersección supra y subesofágica. Estos últimos reciben proyecciones de centros motores avanzados e inervan los músculos de los ojos que junto con sus proyecciones al PeA controlan la dirección de la pupila y conducta de ataque (Young, 1963; Uemura, Yamashita, Haga, Miyazaki, Kondo, & Matsushita, 1987; Wang & Ragsdale, 2019). En la sección posterior se encuentra el lóbulo Paliovisceral central (PV), los lóbulos Cromatóforos Posteriores (ChP) y los lóbulos Vasomotores (Vas). Es la región del cerebro con menor cantidad y mayor tamaño de células, por lo que está asociada directamente con respuestas reflejas (Young, 1963). En estos centros nerviosos basales y mediante influencia de centros supraesofágicos, se controla la respiración, contracción intestinal y los reflejos de nado reclutando otras estructuras para actuar al unísono como el manto o el saco de tinta. Los lóbulos Vas son 6 lóbulos de neuronas pequeñas que aseguran la distribución eficiente de la sangre particularmente desarrollados en los octópodos (Wang & Ragsdale, 2019). Por otro lado, los cromatóforos posterior y anterior están controlados por centros motores avanzados en los lóbulos basales laterales y controlan la dilatación de grupos específicos de cromatóforos (Wang & Ragsdale, 2019).

### 2.2.2. REGIÓN SUPRAESOFÁGICA

Se considera que la vía de información aferente más importante para estos organismos es a través del sistema visual, compuesto por los ojos y las estructuras ópticas del sistema nervioso. Éstas están detrás de cada uno de los ojos, compuestas por un par de

lóbulos ópticos, los más grandes del SN, los lóbulos Olfatorio, Pedunculares y las glándulas ópticas. Los lóbulos ópticos (LO) son centros motores avanzados con alrededor de 65 millones de neuronas considerados los centros más avanzados de procesamiento de información sensorial (Hanlon & Messenger, 2018), que proyectan desde neuronas de primer orden en la capa exterior de la corteza, a las neuronas visuales de segundo orden en la retina profunda pasando por la capa plexiforme. La médula de los LO está compuesta por islotes de cuerpos celulares y neuropilo; involucrada en la codificación de información y aprendizaje visual, además de ser un sitio de memoria visual (Marini, De Sio, Ponte, & Fiorito, 2017; Hanlon & Messenger, 2018; Young, 1963; Kito-Yamashita, Haga, Hirai, Uemura, Kondo, & Kosaka, 1990; Grasso & Basil, 2009; Wang & Ragsdale, 2019). Esta información es enviada a través del tracto óptico a los lóbulos olfatorios (Olf), centros de integración multisensorial (visual y olfativa), que además están involucrados en el crecimiento y la reproducción (Wang, & Ragsdale, 2019; Bertapelle, Polese, & Di Cosmo, 2017). Por otro lado, el lóbulo Peduncular (Ped), está compuesto de pequeñas células granulares que producen delgadas fibras paralelas que proyectan hacia el lóbulo basal del cerebro. Éste recibe información visual y la integra con información de los estatocistos que le permite al organismo la coordinación ocular y motriz para localizar y perseguir presas (Hochner, Shomrat & Fiorito, 2006). Esta organización y función de integración multisensorial ha posicionado al lóbulo peduncular como un análogo al cerebelo vertebrado. Por último, están las glándulas ópticas (GO), que más que participar en procesamiento visual, secretan factores endocrinos que actúan en las gónadas y órganos reproductivos, y son esenciales para la maduración sexual, gametogénesis y cuidado maternal (Wang, Ragsdale, Wang, & Ragsdale, 2019). Toda la información procesada por las estructuras anteriores es comunicada al resto de los lóbulos de la región supraesofágica a través de los nervios ópticos que atraviesan el cráneo cartilaginoso en el que se encuentran.

En la parte inferior de la región supraesofágica están los lóbulos bucal, bucal posterior, basales y el lóbulo periesofágico magnocelular, centros motores avanzados que detonan patrones de actividad complejos. Sin embargo, estos no reciben aferentes directas de la periferia ni proyectan directamente a nervios motores, sino que reciben información

de los analizadores de receptores como el sistema visual y el de los brazos; y estimulan los centros motores basales (Grasso & Basil, 2009; Wang & Ragsdale, 2019). El lóbulo Magnocelular (Mg) recibe información de la región supraesofágica y está asociado con la reacción dinámica y conductas de defensa, reclutando neuronas motoras. El lóbulo Bucal (Bu) cumple tanto funciones de motricidad como de procesamiento sensorial, ya que recibe fibras gustativas de los nervios bucales en su sección inferior, la analiza y desde neuronas motoras en su región superior controla los movimientos del pico. El Bucal Posterior (PBu), a su vez, recibe la información táctil de los brazos, que proyecta a los centros de memoria táctil (Shigeno, & Ragsdale, 2015). Por otro lado están los lóbulos basales que se dividen en anterior, medial, dorsal y laterales. La sección anterior del lóbulo basal (BaA) recibe información visual directamente de los lóbulos ópticos (LO) y proyecta a los lóbulos PeL participando en movimientos de ataque al controlar el arrastre y la cabeza. La sección medial del lóbulo basal (BaM) se comunica directamente con la región subesofágica mediante los lóbulos Pe para controlar el nado y la respiración. Tanto la sección anterior, compuesta por las terminaciones de los tractos ópticos, como la parte posterior del lóbulo Basal Dorsal (BaD) están asociadas a la regulación de actividad visceral (Young, 1963; Uemura et al., 1987). Dentro de esta región se encuentra también el lóbulo Subpeduncular (SubPed), el cual proyecta a las glándulas ópticas participando en la maduración sexual. Esta vía peduncular-glándula óptica-gonadal ha sido identificada como análoga del eje hipotalámico-pituitario-gonadal de vertebrados (Wang, & Ragsdale, 2019). Por último están los lóbulos Basal lateral (BaL) que hacen un continuo con el medial y al igual que el dorsal anterior reciben información de los lóbulos ópticos donde integran información visual con vestibular. Axones de neuronas grandes en esta región proyectan a los lóbulos cromatóforos y están involucrados en la regulación de patrones dinámicos. De esta manera, la computación de la actividad de cromatóforos se realiza en los lóbulos ópticos, se organiza en los lóbulos basales laterales para definir un patrón específico y se ejecuta desde los lóbulos cromatóforos (Young, 1963; Uemura et al., 1987).

En la sección superior supraesofágica están los centros de procesos de aprendizaje de alto orden, los cuales están subdivididos en lóbulos especializados en aprendizaje y memoria quimio-táctil; y procesamiento y memoria visual y espacial asociados a conductas complejas (Young, 1963; Grasso & Basil, 2009; Wang & Ragsdale, 2019). El lóbulo

inferior frontal (IF), recibe tractos nerviosos de los brazos en neuronas sensoriales primarias de sus secciones laterales que proyectan al lóbulo Subfrontal, a la región anterior subesofágica y consecuentemente a los brazos. También recibe información táctil y fibras gustativas del bucal en su sección medial que también proyecta al Subfrontal, a los lóbulos ópticos y al superior frontal formando el sistema de memoria táctil. De entre estas estructuras, particularmente el lóbulo Subfrontal (SubF), con alrededor de 5 millones de neuronas amacrinas, es el blanco principal de aprendizaje y memoria táctil (Young, 1963; Bertapelle, Polese, Di Cosmo, 2017; Wang & Ragsdale, 2019; Shigeno, & Ragsdale, 2015).

En la región supraesofágica superior también se encuentra el área de aprendizaje y memoria visual conformado por los neuropilos interconectados del lóbulo Superior Frontal, Vertical y Subvertical (Bertapelle, Polese, Di Cosmo, 2017; Grasso & Basil, 2009; Wang & Ragsdale, 2019). El lóbulo Superior Frontal (SF) recibe información principalmente de los LO y del IF, que no solo proyectan al neuropilo sino también a la corteza, donde el SF recibe también impulsos del lóbulo vertical. En la sección medial del SF, presente únicamente en octópodos, las fibras ópticas y táctiles se interconectan en un solo tipo neuronas donde sucede la integración multisensorial y que después de formar un plexo, la proyectan al Lóbulo Vertical proporcionando el input principal que llega a esta estructura (Young, 1963; Hochner, Shomrat & Fiorito, 2006;). El Lóbulo Vertical (LV) por su parte, tiene una anatomía única en octópodos, conformado por una corteza que convolucionada en 5 surcos irregulares compuestos por más de 60% del total de neuronas de toda la región supraesofágica, y que cuenta con propiedades neuroquímicas distintas. Sus 25 millones de neuronas amacrinas pequeñas convergen en otras 65,000 neuronas más grandes cuyos axones componen el output hacia el subvertical y a SF lateral. Esta estructura está posicionada en lo más alto de la organización jerárquica del SN, participando en el procesamiento de información de los sistemas visual, quimio-táctil y equilibrio a través de una serie de matrices; pero sobre todo es identificada como el sitio de modulación de la memoria a largo plazo dada su capacidad de presentar plasticidad sináptica como la formación de potenciación a largo plazo (LTP) a partir de actividad glutamatérgica (Young, 1963; Grasso & Basil, 2009; Hochner, Shomrat & Fiorito, 2006; Wang & Ragsdale, 2019; O'Brien, Ponte, & Fiorito, 2019; Hochner, Shomrat & Fiorito, 2006). De esta manera, la información visual de los lóbulos ópticos proyecta al lóbulo SF que releva hacia el LV o

directamente al subvertical para ser regresado a los lóbulos ópticos (Wang & Ragsdale, 2019). Los lóbulos Subverticales (SubV) también tienen una forma y conectividad compleja, dado que su corteza está plegada y produce capas o islotes de células principalmente pequeñas, aunque algunas de ellas son las más grandes de toda la región supraesofágica. El SubV recibe outputs del LV, del SF lateral y del tracto cerebro-braquial; y proyecta al lóbulo precomisural y a otros centros supra-esofágicos. Debajo del subvertical está el lóbulo Precomisural (Prec) cuyo neuropilo desemboca en los PedL constituyendo una vía motora importante entre la región supra y subesofágica (Young, 1963).

Algunos investigadores han agrupado las estructuras de esta región y al IF para referirse a ellas como un solo sistema funcional llamado MSF-LV (Hochner, Shomrat & Fiorito, 2006), que permite varias formas de aprendizaje como evitación, discriminación, aprendizaje observacional, memoria a largo plazo (Grasso & Basil, 2009; Hochner et al., 2003 ). Su función y la alta actividad de proliferación celular en el LV, SubV y Frontal han promovido la comparación de este sistema funcional con el complejo hipocampal vertebrado (Bertapelle, Polese, Di Cosmo, 2017). De esta manera, se considera que los pulpos son organismos capacitados fisiológicamente para procesar gran cantidad de información del ambiente y desplegar conductas complejas. Sin embargo, es importante aclarar que a pesar de que se han realizado algunos estudios electrofisiológicos y farmacológicos para comprobar la función de las estructuras (*Tabla 3*) (Marini, De Sio, Ponte & Fiorito, 2017), la mayoría de la información son suposiciones elaboradas a partir de su neuroanatomía y aún no ha sido comprobada.

<b>Estructura</b>	<b>Procesamiento</b>	<b>Función Asociada</b>
<b>LO</b>	Centro Motor Avanzado, Procesamiento Sensorial	Codificación de información y aprendizaje visual; Sitio de memoria extracerebral
<b>Olf</b>	Centro de integración multisensorial	Crecimiento y reproducción
<b>Ped</b>	Centro de integración multisensorial	Coordinación ocular y motriz para localizar y perseguir presas
<b>PreBra</b>	Centro Motor Basal	Información quimiotáctil; Movimiento individual de los brazos
<b>PosBra</b>	Centro Motor Basal	Control motor de las partes distales de los brazos
<b>PeA</b>	Centro Motor Basal	Movimiento de los brazos en conjunto
<b>PeP</b>	Centro Motor Basal	Control de sifón y retracción de la cabeza; Mecanismo de dirección durante el nado
<b>PeL</b>	Centro Motor Basal	Dirección de la pupila; Dirección de la conducta de ataque
<b>ChA</b>	Centro Motor Basal	Dilatación de grupos específicos de cromatóforos
<b>PV</b>	Centro Regulador Homeostático	Respiración, Contracción intestinal
<b>ChP</b>	Centro Motor Basal	Dilatación de grupos específicos de cromatóforos
<b>Vas</b>	Centro Regulador Homeostático	Distribución eficiente de la sangre
<b>Sif</b>	Centro Regulador Homeostático, Centro Motor Basal	Reflejo de Nado
<b>Bu</b>	Centro Motor Avanzado, Procesamiento Sensorial	Análisis de información gustativa; Movimientos del pico
<b>PBu</b>	Procesamiento Sensorial	Información Táctil de los brazos
<b>BaA</b>	Centro Motor Avanzado	Control de movimientos de arrastre y de la cabeza; Movimiento de ataque
<b>BaM</b>	Centro Motor Avanzado	Control de nado y respiración
<b>BaD</b>	Centro Regulador Homeostático	Regulación de actividad visceral
<b>SubPed</b>	Centro Regulador Homeostático	Maduración sexual
<b>BaL</b>	Centro de integración multisensorial	Regulación de patrones cromatóforos
<b>Mg</b>	Centro Motor Basal	Reacción dinámica y conductas de defensa
<b>Prec</b>	Centro Motor Avanzado	Vía motora al Lóbulo Pedal
<b>IF</b>	Centro de Aprendizaje de Alto Orden	Integración multisensorial; Sistema de memoria Táctil
<b>SubF</b>	Centro de Aprendizaje de Alto Orden	Sistema de memoria Táctil
<b>SF</b>	Centro de Aprendizaje de Alto Orden	Integración multisensorial
<b>LV</b>	Centro de Aprendizaje de Alto Orden	Almacenamiento de información a largo plazo; Integración multisensorial
<b>SubV</b>	Centro de Aprendizaje de Alto Orden	Integración multisensorial

Tabla 3. Estructuras del Cerebro de Pulpo y su función asociada.

LO: Óptico, Olf: Olfatorio, Ped: Peduncular, PreBra: Prebraquial, PosBra: Posbraquial, PeA: Pedal Anterior, PeP: Pedal Posterior, PeL: Pedal Lateral, ChA: Cromatóforo Anterior, PV: Paleovisceral, ChP: Cromatóforo Posterior, Vas: Vasomotor, Sif: Sifón, Bu: Bucal, PBu: Posterior Bucal, BaA: Basal Anterior, BaM: Basal Medial, BaD: Basal Dorsal, SubPed: Subpeduncular, BaL: Basal Lateral, Mg: Magno celular, Prec: Precomisural, IF: Inferior Frontal, SubF: Subfrontal, SF: Superior Frontal, LV: Vertical, SubV: Subvertical.

### 2.3. SEROTONINA EN PULPOS

El estudio de la 5-HT en moluscos ha sido muy importante para comprender los mecanismos celulares de la memoria. A través de investigaciones con *Aplysia* se ha demostrado que la 5-HT tiene un papel crucial en el aprendizaje, particularmente en la plasticidad sensoriomotora a corto y largo plazo (Kandel, Dudai, & Mayford, 2014). De esta manera se ha buscado comprender mejor el sistema serotoninérgico a través del estudio de organismos igual de alejados filogenéticamente a los vertebrados, pero con un sistema nervioso más complejo, como el de los octópodos.

La primera evidencia de presencia de 5-HT en el sistema nervioso de pulpo se obtuvo a través de la inducción de fluorescencia natural con formaldehído y ácido glioxílico en *Octopus vulgaris* (Laws, 1980). A pesar de las dificultades para observar neuronas serotoninérgicas mediante este método dada la inestabilidad de la fluorescencia, fue posible identificar reactividad en el neuropilo de los lóbulos Ped, LO, Olf, LV, SubV, en la región superior del superior del Bu, el ABa, Prec, SubPed, Pe, y el Bra (Matus, 1973; Tansey, 1980). Posteriormente con la técnica de inmunohistoquímica se identificó inmunoreactividad a 5-HT (ir-5-HT) en los somas de estas mismas regiones de *O. vulgaris*, además de en los lóbulos Cromatóforos, el Vas, PV, PBas, el tracto braquial-paliovisceral y los nervios braquiales (Uemura et al., 1987). Poco después, se profundizó en la distribución de 5-HT en los lóbulos ópticos de ésta especie utilizando una técnica de inmunofluorescencia (InFl) y se corroboró su presencia y la efectividad de la técnica a través cromatografía de alta presión (HPLC) (Kito-Yamashita et al., 1990). Años más tarde, se ha observado InFl a 5-HT en el soma de prácticamente todos los lóbulos de *Octopus bimaculoides* tanto en ejemplares recién eclosionados como en adultos. Más recientemente se ha identificado la presencia de 5-HT en el LV únicamente en adultos de la especie, particularmente en los giros laterales de proyecciones provenientes del subV (Wollesen et al., 2012; Shomrat et al., 2010; Shigeno & Ragsdale, 2015). Por otro lado, en el sistema nervioso de los brazos se han encontrado dos tipos de inervación serotoninérgica, una proveniente del cerebro a través del tracto cerebro-braquial y otra red local en el cordón del nervio axial (Bellier, Xie, Farouk, Sakaue, Tooyama, & Kimura, 2017). Aún más, así como en otros moluscos, se ha observado la presencia de 5-HT en las glándulas salivales posteriores de *O. vulgaris* (Martin & Barlow, 1972) y en la saliva de *Octopus maya*, donde



participa en el efecto inmovilizador a presas (Pech-Puch, Cruz-López, Canche-Ek, Campos-Espinosa, García, Mascaro, & Rodríguez-Morales, 2016). Dado que las glándulas posteriores están altamente conectadas al Lóbulo Superior Bu, se considera que una de estas dos estructuras es el lugar de producción y almacenamiento de ésta 5-HT y la del sistema nervioso (Martin & Barlow, 1972; Uemura et al., 1987).

En cuanto a la función de la 5-HT en el sistema nervioso de los octópodos, dada su amplia distribución, se ha sugerido que esta monoamina es un neurotransmisor común que participa en casi cualquier conducta del organismo (Uemura et al., 1987) y cuyo sistema podría estar compuesto de varios receptores específicos para 5-HT (Bellier et al., 2017). De manera más específica, se ha observado que ésta tiene la capacidad de facilitar la formación del LTP en el LV y en los brazos de los pulpos. Sin embargo, a diferencia de los efectos que tiene en *Aplysia*, la 5-HT no tiene la capacidad de provocar la LTP, por lo que se considera que únicamente participa en la memoria a corto plazo de estos organismos (Hochner, Shomrat & Fiorito, 2006; Shomrat, Feinstein, Klein, & Hochner, 2010; Perez, Butler-Struben, & Crook, 2017).

#### 2.4. *OCTOPUS MAYA*

*Octopus maya* (Voss & Solis, 1966) es una especie de pulpo endémica de la península de Yucatán en México, que se caracteriza por tener una coloración marrón oscuro o rojizo, dos ocelos de doble anillo debajo de los ojos y producir huevos de gran tamaño. Los organismos de esta especie son depredadores bentónicos en aguas poco profundas de fondos de roca caliza y sedimento arenoso-limoso cubierto por algunas praderas, rocas coralinas y conchas de gasterópodos. Tiene un ciclo de vida corto de entre 12 y 18 meses, y un crecimiento rápido después de eclosionar, hasta alcanzar a pesar alrededor de 2 kg en la adultez (Voss & Solis Ramírez, 1966; Galindo, Hernández, & Santos, 2014). A diferencia de la mayoría de los octópodos, no presenta etapa paralarvaria (Vidal, 2014). (*Figura 7*)



Figura 7. *Octopus maya*

El interés sobre esta especie particular se ha dado debido a su valor comercial en la región y a la posibilidad de ser criada en cautiverio con relativa facilidad (Van Heukelem, 1976; Walker, Longo, & Bitterman, 1970; Rosas, Cuzon, Pascual, Gaxiola, Chay, Lopez, Maldonado & Domingues, 2007). Este proceso se ha llevado a cabo desde el 2004 en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) en la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación en Sisal (Rosas, Gallardo, Mascaró, Caamal-Monsreal & Pascual, 2014), a partir del cual se han producido una gran cantidad de estudios acerca de diversos temas como desarrollo morfológico de la especie, sistema digestivo, reproducción, etograma e incluso aprendizaje no asociativo y asociativo (Simões, Mascaró, Portela, & Rosas, 2014; Resultados similares han sido obtenidos por nuestro grupo de trabajo). Acerca del sistema nervioso de *O. maya*, existe actualmente un atlas del cerebro, el cual se ha observado presenta cambios neuroanatómicos y conductuales importantes durante las primeras etapas después de la eclosión, semejantes a la maduración en vertebrados y contrario a la noción previa de las especies que no presentan estado paralarvario (Resultados similares han sido obtenidos por nuestro grupo de trabajo). A pesar de las ventajas que provee trabajar con esta especie y la información disponible acerca de su sistema nervioso, hasta la fecha aún no se ha evaluado ningún mecanismo de comunicación neuronal, ni los correlatos neuroanatómicos subyacentes a sus capacidades de memoria y aprendizaje.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A partir de lo anterior es posible afirmar que la 5-HT participa en la mayoría de procesos fisiológicos de prácticamente todos los animales (Azmitia, 2020; Nichols, 2014; Jones, Sun, Martin, & Keating, 2020; Zarindast, Nasehi & Hoseinpoufard, 2014; Carhart-Harris, & Nutt, 2017; Muma & Kapadia, 2020; Cassel, 2020; Marin et al., 2020), y que su función engloba la regulación de capacidades cognitivas y conductas complejas. Sin embargo, no todas las características del sistema serotoninérgico son compartidas entre los taxa (Lillesaar & Gaspar, 2018; Vleugels, Verlinden, Vanden Broeck, 2015; Alavi, Nagasawa, Takahashi, & Osada, 2017) y los efectos finales de esta monoamina en la cognición varían significativamente entre las especies. En el sistema nervioso de los octópodos, el panorama aún no es claro. A diferencia de lo previamente visto en otros moluscos, la 5-HT no provoca los mismos efectos en la memoria de estos animales, y su distribución no parece conservar la divergencia característica del sistema en la que un grupo reducido de neuronas provee de 5-HT al resto del sistema (Lillesaar & Gaspar, 2018). A pesar de que previamente se ha mapeado y corroborado la presencia de 5-HT en el sistema nervioso de algunas especies de pulpo, y se ha identificado su posible papel modulador de la excitabilidad neuronal (Hochner, Shomrat & Fiorito, 2006; Shomrat, Feinstein, Klein, & Hochner, 2010; Perez, Butler-Struben, & Crook, 2017), el funcionamiento de la serotonina en el sistema nervioso de estos animales y su papel en la memoria aún queda por ser definido. De esta manera, cabe preguntarse si ¿la presencia y distribución de 5-HT está conservada en el sistema nervioso de otras especies de octópodos como *O. maya*? y ¿Cuáles son los mecanismos de acción que utiliza la 5-HT para actuar en el sistema nervioso de estos animales?

### 4. JUSTIFICACIÓN

A partir de la inclusión de modelos invertebrados a la investigación en cognición comparada, se logró identificar el papel de la 5-HT como modulador de la excitabilidad neuronal subyacente a la conducta (Pettigrew et al., 2005; Di Giovanni et al., 2020), la flexibilidad inherente del sistema serotoninérgico (Andrade, & Haj-Dahmane, 2020; Carhart-Harris, & Nutt, 2017; Azmitia, 2020) y la importancia de su estudio para

comprender la cognición de cualquier organismo. Aún más, a través del estudio de la 5-HT en moluscos se identificaron los mecanismos celulares de la memoria (Kandel, Dudai, & Mayford, 2014; Kandel & Schwartz, 1982; Marois & Carew, 1997; Kristan & Nusbaum, 1982), por lo que se ha buscado profundizar la investigación utilizando organismos filogenéticamente distantes a los vertebrados como éstos desde entonces (O'Brien, Ponte, & Fiorito, 2019).

Dado que los pulpos poseen el sistema nervioso más complejo de entre los invertebrados, un amplio y sofisticado abanico conductual (Alves, C., Boal, J. G., & Dickel, L., 2008; Hochner, 2013; Di Cosmo, Maselli, & Polese, 2018; Bertapelle, Polese, Di Cosmo, 2017; O'Brien, Ponte, & Fiorito, 2019), y habilidades cognitivas similares a las de los mamíferos y las aves, se les considera organismos fisiológicamente capacitados para ser un buen modelo de conducta compleja y cognición (Borrelli, Chiandetti & Fiorito, 2020; Kuba, Gutnick, & Burghardt, 2014; Hochner, Shomrat & Fiorito, 2006; Schnell & Clayton, 2019). Así, estudiar el papel de la 5-HT en estos animales provee la posibilidad de identificar el origen de rasgos cognitivos y conductuales (Wells & Young, 1969; Huffard, 2007; Vidal, 2014; Mather & Alupay, 2016; Schnell & Clayton, 2021) comúnmente estudiados en el área de la psicología comparada como la memoria, y la evolución de sistemas nerviosos complejos.

Investigar los efectos de la 5-HT en la comunicación neuronal y cognición puede realizarse a través de varias aproximaciones y el uso de diversas técnicas. Sin embargo, la mayoría del conocimiento inicial acerca de la 5-HT deviene de estudios enfocados en la localización de neuronas serotoninérgicas y de los 5-HT<sub>r</sub> en el sistema nervioso, ya que las técnicas histológicas evidencian la manifestación morfológica del funcionamiento de un organismo. Las manipulaciones farmacológicas o genéticas que posteriormente han corroborado estos resultados, demostrando que este tipo de estudios son altamente viables y útiles para este objetivo, siempre y cuando se conozca a profundidad la neuroanatomía funcional de la especie (Di Giovanni et al., 2020; Nichols, 2014; Azmitia, 2020). De esta manera, para identificar el papel de la 5-HT en la comunicación neuronal y cognición de los octópodos es necesario identificar la distribución de 5-HT y la de cierto 5-HT<sub>r</sub> en una región o núcleo específico, y posteriormente corroborar el efecto a través de la conducta (Berger, Gray, & Roth, 2009). Algunos de los 5-HT<sub>r</sub> son muy antiguos y tienen efectos

conservados entre vertebrados e invertebrados, como el receptor 5-HT<sub>1A</sub> en el procesamiento de información, aprendizaje y memoria (Azmitia, 2020; Vleugels, Verlinden, Vanden Broeck, 2015; Sobrido-Camean, Celina Rodicio, & Barreiro-Iglesias, 2018), por lo que evaluar su presencia en el sistema nervioso de los pulpos podría impulsar la investigación posterior para esclarecer el efecto de la 5-HT en la actividad sináptica relacionada a la memoria en el pulpo y encontrar una vía de manipulación farmacológicas útil en evaluaciones conductuales.

Aunado a esto, las técnicas inmunológicas utilizando anticuerpos contra monoaminas y receptores específicos son frecuentemente utilizadas en estudios de este tipo ya que permiten su descripción y localización precisa en distintas partes del sistema nervioso, además de que han sido previamente utilizadas para la localización de 5-HT en el sistema nervioso de pulpos (Alavi, Nagasawa, Takahashi, & Osada, 2017; Kito-Yamashita et al., 1990; Shigeno & Ragsdale, 2015; Bellier et al., 2017).

Por último, la utilización de *O. maya* no solo es adecuada debido a la disponibilidad de obtención de ejemplares y su ciclo de vida corto (Voss & Solis Ramírez, 1966; Galindo, Hernández, & Santos, 2014), sino que principalmente es un buen candidato para la creación de modelos experimentales de evaluación conductual, ya que a través de la crianza en cautiverio y la disposición de un etograma bajo estas condiciones, permite un mayor control experimental y una mejor interpretación de la conducta del animal (Rosas, Gallardo, Mascaró, Caamal-Monsreal & Pascual, 2014; González-Navarrete, 2021).

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. OBJETIVO GENERAL

Mapear la distribución serotoninérgica en el cerebro de *O. maya* a través de una técnica de inmunofluorescencia.

### 5.2. OBJETIVO PARTICULAR

Identificar en qué estructuras del cerebro de *O. maya* hay presencia de 5-HT y del receptor 5-HT<sub>1A</sub> para identificar los posible efectos de este neurotransmisor en el organismo.

## 6. HIPÓTESIS

### 6.1. HIPÓTESIS GENERAL

Se encontrará inmunofluorescencia de 5-HT y receptor 5-HT<sub>1A</sub> en estructuras del cerebro de *O. maya* previamente relacionadas con el procesamiento de información, memoria y aprendizaje.

## 7. MÉTODO

### 7.1. SUJETOS

Se utilizó el cerebro de un ejemplar adulto de *O. maya*, de alrededor de 6 meses post eclosión, criado en cautiverio proveniente del Laboratorio de Ecofisiología Aplicada en la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación UNAM ubicada en Sisal, Yucatán, México (*Anexo 1*).

### 7.2. MATERIALES

El procesamiento histológico del cerebro fue realizado por La Unidad de Histología del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM en la Ciudad de México utilizando un procesador de tejidos Lupetec (PT09TS), un dispensador de parafina Leica (eg 1120) y un Microtomo LKB Broma (2218, historange microtome) del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Para montar los cortes se utilizó un baño de flotación Lab-line (Hertz), portaobjetos cargados (ColorFrost Plus, Fisherbrand) y Fluoromount-G (00-4958-02, Invitrogen, Thermo Fisher).

Todo el PBS utilizado durante el proceso de preparación de tejido e inmunomarcaje fue preparado con agua salada al 3.5% de NaCl. La recuperación de antígeno se realizó con un buffer de citratos, la permeabilización con una disolución de Tween 20 [1:50 o 0.2%] en PBS; y el bloqueador se elaboró con suero equino (biowest, Cat# S0900-500, [1:20]) y Tween 20 (Sigma, P1379-500ML, [1:1000]) en PBS (*Anexo 2*). Se utilizó los siguientes reactivos para la técnica de inmunofluorescencia:

Antígeno	Descripción	Fuente, ID	Dilución	Referencia
5-HT	Anticuerpo primario en conejo policlonal conjugado con formaldehído a albúmina de suero bovino	Sigma-Aldrich Cat# S5545, RRID:AB_477522;	[1 µg/ ml]	(Shigeno & Ragsdale, 2015)
5-HT1A	Anticuerpo primario en conejo policlonal	Abcam Cat# ab85615, RRID:AB_10696528	[5 µg/ml]	(Jeong, Hwang, Jo, Kim, Ahn, Suh, & Choi, 2021).
Conejo IgG	Anticuerpo Secundario H&L en cabra policlonal Alexa Fluor 488	Abcam Cat# ab150077, RRID:AB_2630356	[2 ug/ml]	(Shigeno & Ragsdale, 2015)

Tabla 4. Anticuerpos primarios y secundario

Para la visualización de las muestras se utilizó un microscopio de epifluorescencia (VELAB, VE-146YT). Las imágenes se obtuvieron utilizando una cámara de 12Mpx con control de exposición automática (Iphone 6s, Apple) y la video cámara integrada del microscopio de 10Mpx (VELAB, VE-LX1000) a través del programa de captura ImageView (x86, 3.7.9229.20170607). Éstas fueron procesadas utilizando los programas ImageJ (1.53a) y la reconstrucción utilizando Adobe Photoshop (Versión 22.2.0). El análisis estadístico y la construcción de gráficas se llevó a cabo utilizando el programa Prism 9 (Version 9.1.1, 223).

### 7.3. PROCEDIMIENTO

El cerebro dentro del cráneo fue preservado en etanol al 70% de concentración, por alrededor de 8 meses. La obtención de tejido comenzó retirando el cráneo y limpiando el tejido para remover el cartílago y músculo hasta dejar los ojos, lóbulos ópticos y cerebro expuestos. Se seccionó longitudinalmente el cerebro en 2 mitades y se preservó en una disolución de formaldehído al 4% de concentración y agua salada (NaCl) al 3.5% a una temperatura de 4°C durante 48 hrs (*Anexo 1*).

Para el procesamiento del tejido, los cerebros se sometieron a un proceso de deshidratación a través de baños en disoluciones con concentraciones ascendentes de etanol y finalizaron con un paso de aclaración en Xileno antes de ser sumergidos y embebidos en un bloque en parafina. Se obtuvieron cortes consecutivos de 10 µm, que posteriormente fueron desparafinados a 60°C durante 2 hrs y rehidratados a través de baños en disoluciones con concentraciones descendentes de etanol, comenzando por xileno hasta finalizar en agua destilada. A continuación, se realizó la recuperación de antígeno mediante la sumersión en buffer de citratos a 90°C durante 15 min. Para finalizar la preparación de tejido, se expuso

el tejido a una fase de permeabilización durante 20 min en oscuridad, seguido de lavado; y posteriormente de una fase de bloqueo durante 1 hr.

El inmunomarcaje se llevó a cabo exponiendo la mitad de las muestras al anticuerpo primario Anti-5-HT (Grupo 5-HT) y la otra mitad a Anti-5-HT1A (Grupo 5-HT1A); se dejó incubar durante la noche a 4°C y fue lavado con PBS. Posteriormente se expuso el tejido al anticuerpo secundario anti-conejo IgG [2 µg/ml de PBS] durante 1 hr en oscuridad a temperatura ambiente. Para concluir, se lavó el anticuerpo secundario y se protegió cada tejido con Fluoromount y cubreobjetos. De manera similar, los grupos controles (Control 5-HT, Control 5-HT1A) fueron expuestos exactamente al mismo procedimiento a excepción de la administración del anticuerpo primario (*Anexo 2*).

La visualización de la InFl se observó en un microscopio de epifluorescencia utilizando un rango de excitación de 420 a 490 nanómetros. Se obtuvieron las imágenes de los tejidos ( $N=1$ , *por grupo*) a través del ocular utilizando un objetivo con aumento 10x. Éstas fueron limpiadas utilizando la herramienta “Sustraer Fondo” del programa ImageJ y se determinó el radio de contraste de manera que el fondo de la imagen tuviera una intensidad lumínica de 0, siendo 35 px para los grupos 5-HT (*Anexo 3*) y 50 px para los grupos 5-HT1A (*Anexo 4*).

#### 7.4. ANÁLISIS DE DATOS

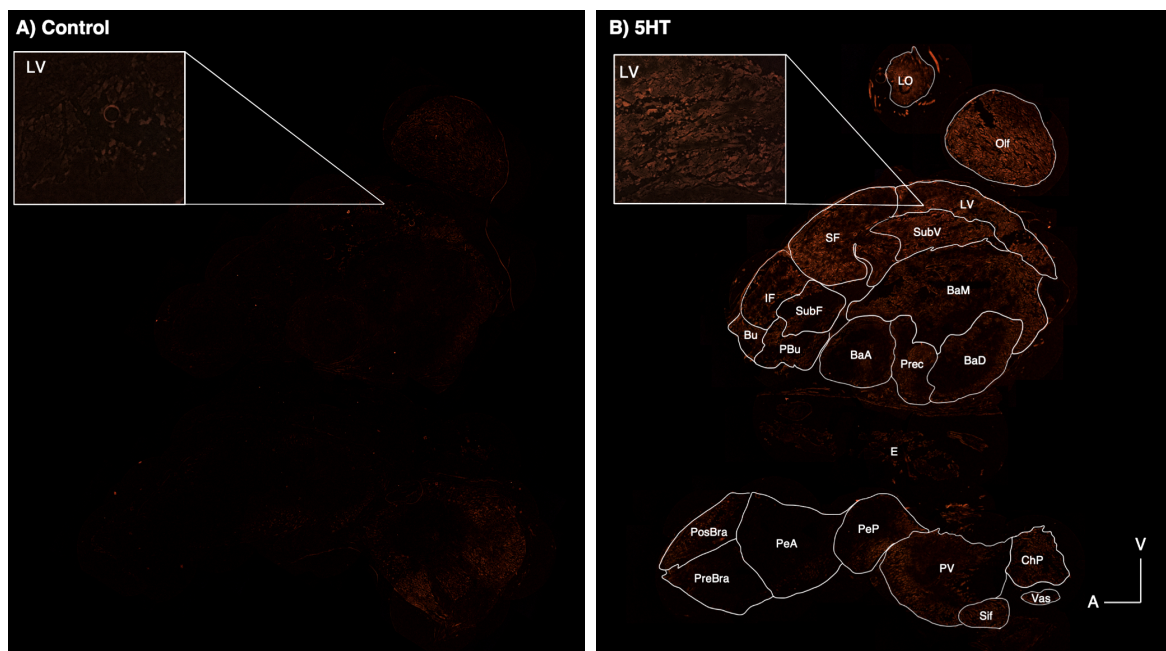
Para cuantificar la InFl, se midió el área y la intensidad de brillo (IntDen) de las estructuras de cada grupo, a partir del cual se obtuvo un Coeficiente de Fluorescencia (CF) en función del área promedio de las estructuras de su respectivo grupo (*Anexo 5*). Posteriormente, se obtuvo el Coeficiente de Fluorescencia Corregido (CFC) a partir de la sustracción del CF de los grupos control, del CF de los grupos experimentales, obteniendo así la InFl normalizada de cada estructura (Bankhead, 2014). Esta fue dividida en cuartiles, identificando las estructuras con mayor presencia de InFl dentro de cada uno de los grupos. Por último, para comparar la InFl general de las estructuras de la región supraesofágica y subesofágica dentro de cada grupo (5-HT, 5-HT1A) se utilizó una prueba no paramétrica U de Mann–Whitney para muestras independientes.



## 8. RESULTADOS

### 8.1. INMUNOFLUORESCENCIA TIPO 5-HT

A partir de la inspección visual de las imágenes obtenidas se observó InFl tipo 5-HT en las estructuras LO, Olf, LV, SubV, SF, IF, SubF, PBu, Bu, BaA, Prec, BaM, BaD, ChP, Vas, Sif, PV, PeP, PeA, PosBra y PreBra (*Figura 8*). Posterior a la cuantificación de la InFl de cada una de las estructuras y la comparación con su respectivo control para eliminar la fluorescencia por inespecificidad, se identificó InFl tipo 5-HT en el LO, Olf, LV, SubV, SF, IF, SubF, PBu, Bu, BaA, Prec, BaM, BaD, Vas, Sif, PV, PeP, PeA, PosBra y PreBra (*Figura 9A*).



*Figura 8. Localización de Inmunofluorescencia tipo 5-HT.*

*Reconstrucción del cerebro de *O. maya* a partir de un corte sagital medial; A) Grupo control mostrando la ausencia de InFl; (B) Grupo 5-HT mostrando la presencia de InFl tipo 5-HT; Cajas: Ampliación del LV de cada grupo; LO: Óptico, Olf: Olfatorio, LV: Vertical, SubV: Subvertical, SF: Superior Frontal, IF: Inferior Frontal, SubF: Subfrontal, Bu: Bucal, PBu: Posterior Bucal, BaA: Basal Anterior, Prec: Precomisural, BaD: Basal Dorsal, BaM: Basal Medial, E: Esófago, ChP: Cromatóforo Posterior, Vas: Vasomotor, Sif: Sifón, PV: Paleovisceral, PeP: Pedal Posterior, PeA: Pedal Anterior, PosBra: Posbraquial, PreBra: Prebraquial.*

Al dividir la InFl de cada estructura en cuartiles, se identificó al lóbulo Olf encabezando el percentil 25% con mayor InFl, seguido por el BaM, SF y el SubV; a las estructuras LV, LO, PV, IF, BaD por encima de la mediana; al Prec, SubF, PBu, BaA y PreBra por debajo; y al PeP, PosBra, PeA y Bu en el percentil 25% con menor InFl (Mediana = 2.12715318; Q1 = 4.75, Q2 = 9.5, Q3 = 14.25, RIQ = 9.5). De esta manera, se

encontró que la InFl tipo 5-HT observada en la región supraesofágica fue significativamente mayor que aquella observada en la región subesofágica (0.0018,  $p < 0.05$ ) (Figura 9B). En contraste, la normalización del CF mostró la ausencia de InFl en los lóbulos ChP, Vas y Sif (Figura 9A)

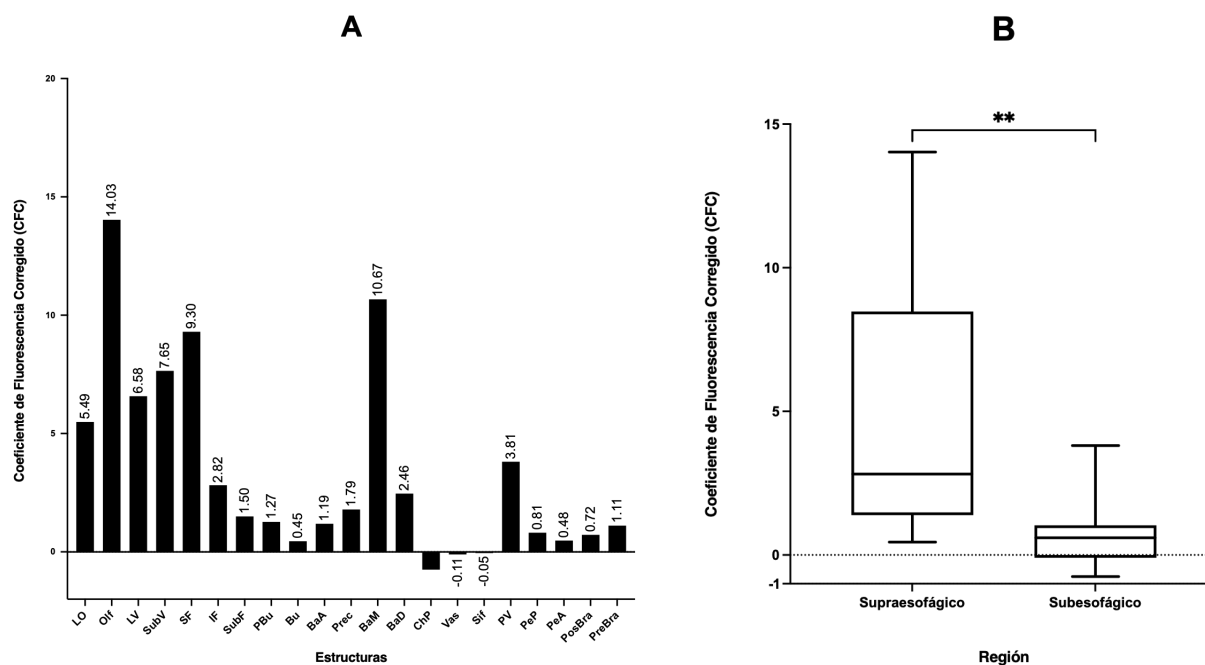


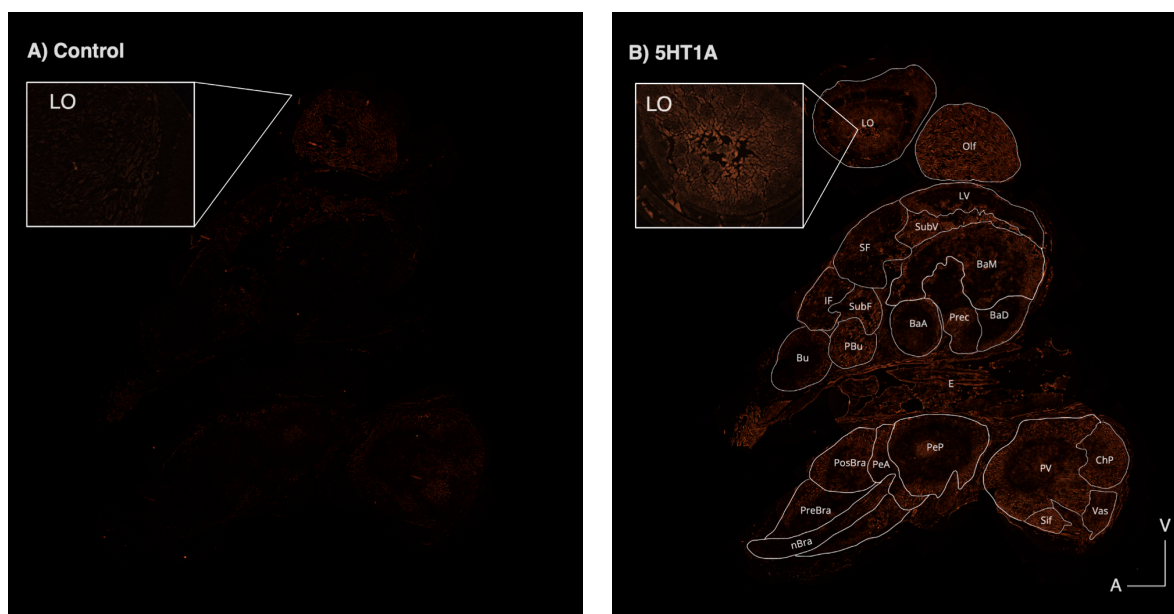
Figura 9. Cuantificación de InFl tipo 5-HT en el cerebro de *O. maya*

A) Coeficiente de fluorescencia obtenido a través de la cuantificación de la intensidad de brillo de cada una de las estructuras y su normalización a partir de la sustracción del brillo de su respectivo control. B) Comparación del Coeficiente de fluorescencia entre la región supraesofágica y subesofágica. Las líneas muestran la mediana de cada grupo. U de Mann-Whitney de dos colas, significancia estadística  $P < 0.05$ ;  $U=11$ ,  $n1=13$ ,  $n2=8$ ,  $** P = 0.001-0.01$ ,  $* P = 0.01-0.05$ . LO: Óptico, Olf: Olfatorio, LV: Vertical, SubV: Subvertical, SF: Superior Frontal, IF: Inferior Frontal, SubF: Subfrontal, Bu: Bucal, PBu: Posterior Bucal, BaA: Basal Anterior, Prec: Precomisural, BaD: Basal Dorsal, BaM: Basal Medial, E: Esófago, ChP: Cromatóforo Posterior, Vas: Vasomotor, Sif: Sifón, PV: Paleovisceral, PeP: Pedal Posterior, PeA: Pedal Anterior, PosBra: Posbraquial, PreBra: Prebraquial.

## 8.2. INMUNOFLORESCENCIA TIPO 5-HT1A

En cuanto a la presencia de InFl tipo 5-HT1A, a partir de la inspección visual de las imágenes obtenidas se observó InFl en las estructuras LO, Olf, LV, SubV, SF, IF, SubF, PBu, Bu, BaA, Prec, BaM, BaD, ChP, Vas, Sif, PV, PeP, PeA, PosBra, PreBra y en el nBra

dentro del PreBra, PosBra y PeA (*Figura 10*). Posterior a la normalización de InFl de cada una de las estructuras con su respectivo control, se corroboró la presencia de InFl tipo 5-HT1A en todas las estructuras anteriores (*Figura 11A*). Al dividir la InFl de cada estructura en cuartiles, se identificó al lóbulo LO encabezando el percentil 25% con mayor InFl, seguido por el PV, Olf, BaM y el PeP; a las estructuras LV, ChP, Prec, PosBra, SubV y PreBra por encima de la mediana; al SubF, PeA, IF, SF, PBU, y Sif por debajo; y a las estructuras Bu, BaA, BaD, Vas y nBra en el percentil 25% con menor InFl (Mediana = 5.24389667; Q1 = 5.75, Q2= 11.5, Q3 = 17.25, RIQ = 11.5). De esta manera, no se encontraron diferencias significativas al comparar la InFl observada en la región supraesofágica con la observada en la región subesofágica (0.8446,  $p < 0.05$ ) (*Figura 11B*).



*Figura 10. Localización de Inmunofluorescencia tipo 5-HT1A.*

*Reconstrucción del cerebro de *O. maya* a partir de un corte sagital medial. A) Grupo control mostrando la ausencia de InFl; (B) Grupo 5-HT1A mostrando la presencia de InFl tipo 5-HT1A; Cajas: Ampliación del LV de cada grupo; LO: Óptico, Olf: Olfatorio, LV: Vertical, SubV: Subvertical, SF: Superior Frontal, IF: Inferior Frontal, SubF: Subfrontal, Bu: Bucal, PBU: Posterior Bucal, BaA: Basal Anterior, Prec: Precomisural, BaD: Basal Dorsal, BaM: Basal Medial, E: Esófago, ChP: Cromatóforo Posterior, Vas: Vasomotor, Sif: Sifón, PV: Paleovisceral, PeP: Pedal Posterior, PeA: Pedal Anterior, PosBra: Posbraquial, PreBra: Prebraquial, nBra: Nervio Braquial.*

En ambos grupos, la mayoría del inmunomarcaje se observó en la región del pericarion de las estructuras, aunque también se observó cierta reactividad en la región del neuropilo, mayormente en el grupo 5-HT1A (*Tabla 5*).

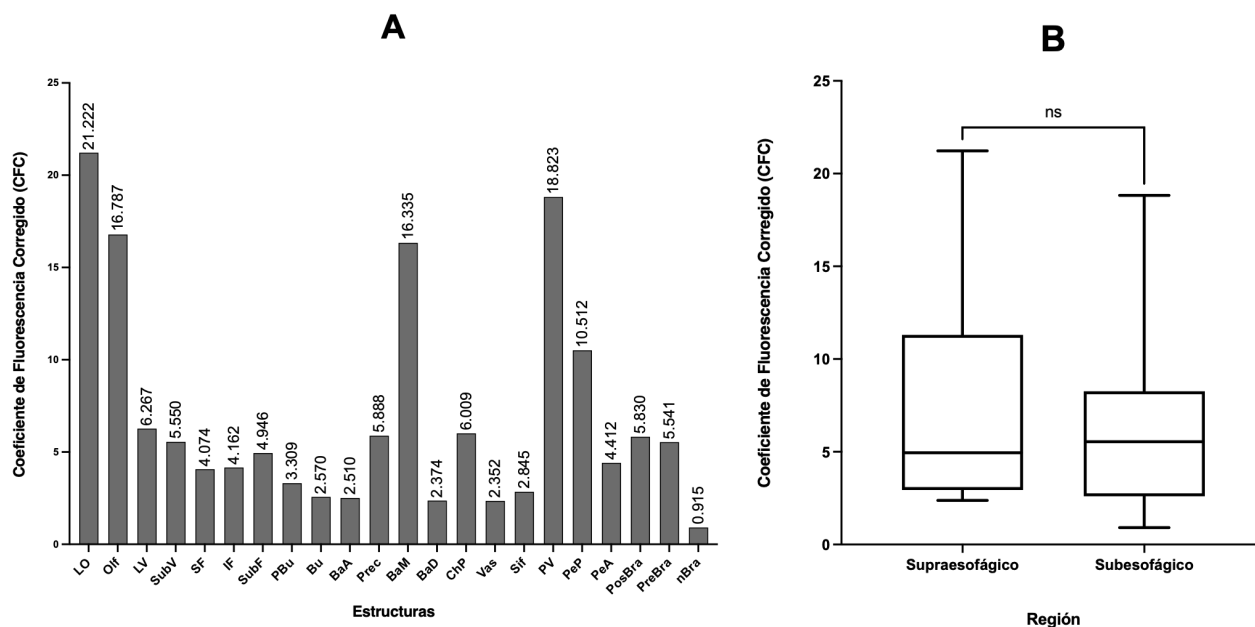


Figura 11. Cuantificación de InFl tipo 5-HT1A en el cerebro de *O. maya*.

A) Coeficiente de Fluorescencia obtenido a través de la cuantificación de la intensidad de brillo de cada una de las estructuras y su normalización a partir de la sustracción del brillo de su respectivo control; B) Comparación del Coeficiente de fluorescencia entre la región supraesofágica y subesofágica. Las líneas muestran la mediana de cada grupo. U de Mann-Whitney de dos colas, significancia estadística  $P < 0.05$ ;  $U=55$ ,  $n1=13$ ,  $n2=9$ ; ns  $P \geq 0.05$  (no significativo). LO: Óptico, Olf: Olfatorio, LV: Vertical, SubV: Subvertical, SF: Superior Frontal, IF: Inferior Frontal, SubF: Subfrontal, Bu: Bucal, PBU: Posterior Bucal, BaA: Basal Anterior, Prec: Precomisural, BaD: Basal Dorsal, BaM: Basal Medial, E: Esófago, ChP: Cromatóforo Posterior, Vas: Vasomotor, Sif: Sifón, PV: Paleovisceral, PeP: Pedal Posterior, PeA: Pedal Anterior, PosBra: Posbraquial, PreBra: Prebraquial, nBra: Nervio Braquial.

### 8.3. INMUNOFLUORESCENCIA TIPO 5-HT Y 5-HT1A

Al realizar una comparación entre ambos tipos de InFl en las estructuras del cerebro de *O. maya* fue posible observar una diferenciación en la distribución de 5-HT y su receptor 5-HT1A. La InFl tipo 5-HT se observó principalmente en las estructuras de la región supraesofágica en comparación con aquellas de la región subesofágica. En cambio, se observó InFl tipo 5-HT1A en las mismas estructuras del cerebro de *O. maya* donde se observó InFl tipo 5-HT además de en los lóbulos ChP, Vas, Sif y en el nBra dentro del PreBra, PosBra y PeA (Figura 11).

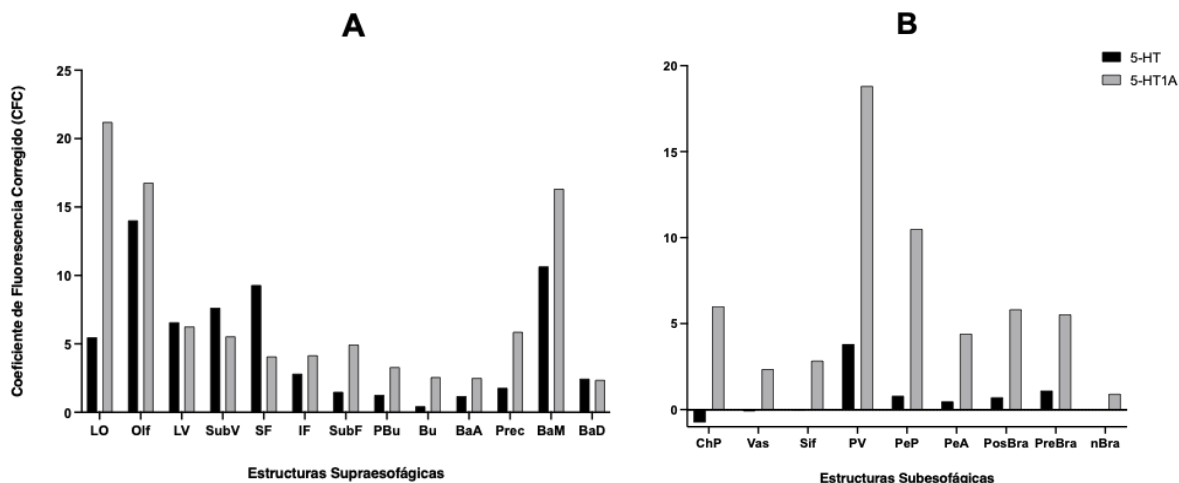


Figura 12. Presencia de InFl tipo 5-HT y 5-HT1A en las estructuras del cerebro de *O. maya*. Normalización porcentual del CFC de cada una de las estructuras de ambos grupos para eliminar las diferencias del procesamiento de imagen anterior a la cuantificación de Intensidad de Brillo. Separadas por A) estructuras supraesofágicas y B) subesofágicas. LO: Óptico, Olf: Olfatorio, LV: Vertical, SubV: Subvertical, SF: Superior Frontal, IF: Inferior Frontal, SubF: Subfrontal, Bu: Bucal, PBu: Posterior Bucal, BaA: Basal Anterior, Prec: Precomisural, BaD: Basal Dorsal, BaM: Basal Medial, E: Esófago, ChP: Cromatóforo Posterior, Vas: Vasomotor, Sif: Sifón, PV: Paleovisceral, PeP: Pedal Posterior, PeA: Pedal Anterior, PosBra: Posbraquial, PreBra: Prebraquial, nBra: Nervio Braquial.

El receptor 5-HT1A generalmente participa como un autoreceptor somatodendrítico inhibitorio de la actividad serotoninérgica (Nowak et al., 2006; Kumar, & Kishore, 2020; Nichols, 2014), lo cual es consistente con la colocación de InFl tipo 5-HT y al receptor 5-HT1A observada en este estudio. Sin embargo, también puede ser expresado en áreas postsinápticas serotoninérgicas, lo que concuerda con la ausencia de InFl tipo 5-HT y presencia del receptor 5-HT1A observada en los lóbulos ChP, Vas, Sif y el nBra (Figura 12).

## 9. DISCUSIÓN

### 9.1. INMUNOFLUORESCENCIA TIPO 5-HT EN EL CEREBRO DE *O. MAYA*

Considerando que investigar el sistema serotoninérgico de especies filogenéticamente distantes a los mamíferos propone una oportunidad para comprender el desarrollo evolutivo de sistemas nerviosos complejos y la emergencia de capacidades cognitivas, y que los pulpos son organismos fisiológicamente capacitados para ser un buen modelo de cognición (Borrelli, Chiandetti & Fiorito, 2020; Kuba, Gutnick, & Burghardt, 2014; Hochner, Shomrat & Fiorito, 2006; Schnell & Clayton, 2019); en este estudio se

evaluó la ubicación de 5-HT en el cerebro de *O. maya* utilizando una técnica de inmunofluorescencia. De manera consistente con la literatura anterior (Uemura et al., 1987; Di Cosmo & Di Cristo, 1998; Shomrat, et al., 2010; Shigeno, S., & Ragsdale, 2015; Bellier, et al., 2017), se observó InFl tipo 5-HT en los lóbulos LO, Olf, LV, SubV, SF, IF, SubF, PBu, Bu, BaA, Prec, BaM, BaD, Vas, Sif, PV, PeP, PeA, PosBra y PreBra. Al igual que en otros estudios (Alavi, Nagasawa, Takahashi, & Osada, 2017), ésta InFl se observó tanto en el pericarion como en algunos neuropilos de las estructuras, señalando los posibles lugares de síntesis, liberación y recaptación de 5-HT.

Dado que previamente se han realizado estudios de cromatografía para corroborar la presencia de 5-HT en algunas de estas estructuras (Kito-Yamashita et al., 1990; Pech-Puch, 2016), es posible atribuir el inmunomarcaje observado aquí como indicador de la presencia de 5-HT en el cerebro de *O. maya*. Por otro lado, a partir de la comparación de estos resultados con aquellos obtenidos del grupo control fue posible observar la ausencia de InFl en los lóbulos ChP y Vas de esta especie, lo cual contrasta con la evidencia previa (Uemura et al., 1987). Aunado a esto, no se observó InFl en el lóbulo Sif, estructura que no había sido evaluada anteriormente. Este tipo de diferencias en la localización de la 5-HT dentro del cerebro del pulpo se ha observado anteriormente, particularmente a partir de la utilización de diferentes técnicas (Laws, 1980; Matus, 1973; Tansey, 1980; Uemura et al., 1987; Kito-Yamashita et al., 1990; Wollesen et al., 2012; Shomrat et al., 2010; Shigeno & Ragsdale, 2015). Por lo cual, es importante mencionar que en función de la información revisada aquí, actualmente existe únicamente un estudio que utilizó técnicas de inmunomarcaje para identificar la presencia de 5-HT en todas las estructuras del cerebro de pulpo a la vez (Uemura, Yamashita, Haga, Miyazaki, Kondo, & Matsushita, 1987), procedimiento que no había sido replicado hasta ahora. De esta manera, se requiere mayor investigación para corroborar esta información, y utilizando los mismos protocolos para facilitar la comparación de los resultados, acompañados de técnicas de identificación bioquímica en cada una de las estructuras evaluadas.

La distribución semigeneralizada de la 5-HT (*Tabla 5*) en el cerebro del pulpo es consistente con la noción de que este neurotransmisor está implicado en prácticamente cualquier proceso autonómico y capacidad cognitiva (Hensler, 2012). Sin embargo, la presencia predominante de InFl tipo 5-HT en las estructuras de la región supraesofágica en

comparación con aquellas de la región subesofágica, no solo aporta a la diferenciación de funciones controladas por cada región (Young, 1963; O'Brien, Ponte, & Fiorito, 2019), sino que refuerza la noción de especificidad de la 5-HT como neurotransmisor involucrado en el procesamiento de información y en la cognición (Hensler, 2012; Azmitia, 2020), tanto en los octópodos como en los vertebrados.

<b>Estructura</b>	<b>5-HT</b>	<b>5-HT1A</b>
LO	Cuerpos celulares región de la corteza	Médula y región posterior de la corteza
Olf	Cuerpos celulares de zona basal del neuropilo	Zona basal del neuropilo
LV	Pericarion y neuropilo	Pericarion y zona basal del neuropilo
SubV	Islotes de cuerpos celulares en región anterior y posterior	Islotes de cuerpos celulares en región anterior y posterior
SF	Pericarion y neuropilo	Pericarion y región medial del neuropilo
IF	Pericarion y región medial del neuropilo	Pericarion y región medial del neuropilo
SubF	Pericarion	Pericarion
PBU	Pericarion	Pericarion
Bu	Región superior de pericarion	Región superior de pericarion
BaA	Pericarion y región medial del neuropilo	Pericarion y región medial del neuropilo
Prec	Región anterior y ventral de pericarion	Región anterior de pericarion
BaM	Pericarion y región medial del neuropilo	Pericarion y región medial del neuropilo
BaD	Pericarion	Región dorsal y posterior de pericarion
ChP	-	Pericarion
Vas	-	Pericaria y región medial del neuropilo
Sif	-	Pericarion
PV	Pericarion	Pericarion y región medial del neuropilo
PeP	Región dorsal y posterior del Pericarion	Pericarion
PeA	Región dorsal del Pericarion	Pericarion
PosBra	Región ventral del Pericarion	Región anterior del pericarion y medial-dorsal del neuropilo
PreBra	Región ventral del Pericarion y neuropilo	Pericarion
nBra	-	Fibras en el PreBra, PosBra y PeA

*Tabla 5. Localización de inmunofluorescencia tipo 5-HT y 5-HT1A en las estructuras del cerebro de O. maya. LO: Óptico, Olf: Olfatorio, LV: Vertical, SubV: Subvertical, SF: Superior Frontal, IF: Inferior Frontal, SubF: Subfrontal, Bu: Bucal, PBU: Posterior Bucal, BaA: Basal Anterior, Prec: Precomisural, BaD: Basal Dorsal, BaM: Basal Medial, E: Esófago, ChP: Cromatóforo Posterior, Vas: Vasomotor, Sif: Sifón, PV: Paleovisceral, PeP: Pedal Posterior, PeA: Pedal Anterior, PosBra: Posbraquial, PreBra: Prebraquial, nBra: Nervio Braquial. - : ausencia de InFl.*

## 9.2. INMUNOFLUORESCENCIA TIPO 5-HT1A EN EL CEREBRO DE *O. MAYA*

A pesar de que la presencia de 5-HT en el cerebro de pulpos ha sido corroborada, se conoce muy poco acerca de su participación en la cognición y conducta de estos animales. Anteriormente se ha identificado que tiene un efecto facilitador en la formación de LTP en

el LV (Hochner et al., 2006; Shomrat et al., 2010; Perez et al., 2017; y que la administración intramuscular en los brazos de 5-HT (0.2 mg/ $\mu$ L) en una dosis de 20 mg/kg de saliva de pulpo, provoca una sedación local acompañada de inhibición de cromatóforos (Pech-Puch, et al., 2016); sin embargo los mecanismos de acción de 5-HT en la comunicación neuronal aún no han sido identificados. En este estudio, se observó InFl tipo 5-HT<sub>1A</sub> en las mismas estructuras del cerebro de *O. maya* donde se observó InFl tipo 5-HT: el LO, Olf, LV, SubV, SF, IF, SubF, PBU, Bu, BaA, Prec, BaM, BaD, PV, PeP, PeA, PosBra y PreBra; además de en los lóbulos ChP, Vas, Sif y en el nBra dentro del PreBra, PosBra y PeA (*Figura 11*).

El receptor 5-HT<sub>1A</sub> es un GPCR cuyo mecanismo de acción es la apertura de canales de K<sup>+</sup> y la disminución de los niveles de AC y cAMP, por lo que se le considera un receptor inhibitorio (Kumar, & Kishore, 2020; Nichols, 2014; Hensler, 2012; Carhart-Harris, & Nutt, 2017). Su participación en la integración de información, aprendizaje, memoria, y en la regeneración axonal son funciones conservadas tanto en vertebrados como invertebrados (Vleugels et al., 2015; Azmitia, 2020; Marin., Bécamel, Chaumont-Dubel, Vandermoere, Bockaert, & Claeysen, 2020), y que dada la presencia de InFl observada aquí en el lóbulo Ped, los sistemas de memoria visual y táctil (Vleugels et al., 2015; Hochner, Shomrat & Fiorito, 2006), y en lóbulos donde anteriormente se ha observado sinaptogénesis (Vleugels et al., 2015) como el OL, Olf, LV, IF, SF, SubV (De Lisa, De Maio, Moroz, Moccia, Mennella, & Di Cosmo, 2012; Bertapelle, Polese, Di Cosmo, 2017), parecen estar conservadas también en *O. maya*.

La observación del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en el complejo MSF-LV también aporta a las similitudes entre estas estructuras y el hipocampo vertebrado (Hochner, Shomrat & Fiorito, 2006), particularmente al CA3, la estructura donde se encuentra la mayor expresión de este receptor fuera del NR (Glikmann-Johnston, Saling, Reutens, & Stout, 2015). Aún más, se ha considerado que la formación de LTP en el MSF-LV, se asemeja al LTP independiente de NMDA (Grasso & Basil, 2009; (Hochner, Shomrat & Fiorito, 2006; Shomrat, Feinstein, Klein, & Hochner, 2010; Perez, Butler-Struben, & Crook, 2017) que ocurre en las fibras musgosas del CA3 (Alkadhi, 2021). Esto, aunado a la capacidad moduladora de la excitabilidad neuronal del receptor (Di Giovanni et al., 2020), podría proponerlo como un posible mecanismo subyacente a este tipo de plasticidad sináptica.



El receptor 5-HT<sub>1A</sub> generalmente participa como un autoreceptor somatodendrítico inhibitorio de la actividad serotoninérgica (Nowak et al., 2006; Kumar, & Kishore, 2020; Nichols, 2014), lo cual es consistente con la colocalización de InFl tipo 5-HT y al receptor 5-HT<sub>1A</sub> observada en este estudio. Sin embargo, también puede ser expresado en áreas postsinápticas serotoninérgicas, lo que concuerda con la ausencia de InFl tipo 5-HT y presencia del receptor 5-HT<sub>1A</sub> observada en los lóbulos ChP, Vas, Sif y el nBra (*Figura 12*). Dado que anteriormente se han identificado varios neuromoduladores en el sistema nervioso de los pulpos (Messenger, 1996; Wollesen et al., 2012; Shigeno & Ragsdale, 2015) y algunos de ellos se han observado co-localizados con serotonina, es posible considerar que el sistema serotoninérgico de los pulpos funge también como neuromodulador de otros neurotransmisores (Furness & Costa, 1975; O'Brien, Ponte, & Fiorito, 2019; Wollesen et al., 2012; Bellier et al., 2017; Messenger, 1996). Particularmente, su presencia en el lóbulo Olf podría ser consistente con el papel previamente observado de este receptor en la producción de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) en mamíferos, dado que el lóbulo Olf tiene una innervación estrecha con la glándula óptica, secretor endócrino cuyo eje de conexión con las gónadas se ha considerado análogo al eje HPA (Di Cosmo & Polese, 2016; Wang et al., 2019). De igual manera, su presencia en los lóbulos BaD, PV, Vas y Sif podría indicar la participación del receptor en la regulación homeostática, lo cual concuerda con la previa asociación de este receptor a funciones cardiovasculares, el ritmo cardíaco, presión arterial y vasoconstricción en mamíferos (Hensler, 2012; Kumar, & Kishore, 2020).

Anteriormente no se ha encontrado relación funcional entre centros motores y la actividad del receptor 5-HT<sub>1A</sub>, sin embargo aquí se observó InFl tipo 5-HT<sub>1A</sub> en los lóbulos Bu, BaA, Prec, BaM, PeP, PeA, PosBra, PreBra y ChP. Esta distribución podría ser asociada a una posible modulación inhibitoria de otros neurotransmisores y neuropéptidos previamente identificados en estas estructuras, como la acetilcolina, acetilcolinesterasa, noradrenalina, octopamina, L-glutamato, somatostatina, oGNRH o FMRFamida (Messenger, 1996; Shigeno & Ragsdale, 2015). Lo mismo se podría decir para la InFl tipo 5-HT<sub>1A</sub> observada en los centros de procesamiento sensorial como los lóbulos LO, Bu y PBu. Por otro lado, a pesar de que en este estudio no se incluyó al sistema nervioso del brazo en la evaluación, la presencia de InFl tipo 5-HT<sub>1A</sub> en el nBra dentro del PreBra,

PosBra y PeA es consistente con la previa descripción del sistema serotoninérgico en esta región (Bellier et al., 2017). Esto podría indicar una posible modulación de la motricidad desde el PreBra, PosBra y PeA hacia los brazos, quizá inhibiendo los reflejos conductuales originados en el sistema nervioso de los brazos. La presencia del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en los brazos de los octópodos también podría indicar el posible mecanismo de acción del efecto sedante de la 5-HT en la región (Pech-Puch, et al., 2016). Aún más, podría explicar el efecto de la Fluoxetina en producir disparos espontáneos en la periferia (Perez et al., 2017), ya que ésta disminuye la expresión y actividad de los autoreceptores 5-HT<sub>1A</sub> (Di Giovanni et al., 2020).

De manera más general, a partir de la ubicación compartida entre 5-HT y 5-HT<sub>1A</sub> observada en este estudio (*Figura 11*) y dada la característica de autoreceptor del 5-HT<sub>1A</sub>, se podría considerar que la producción de 5-HT no ocurre en un solo sitio dentro del organismo como se había propuesto anteriormente (Martin & Barlow, 1972; Uemura et al., 1987), sino que las neuronas sintetizadoras de 5-HT están distribuidas de manera generalizada en las estructuras del cerebro del pulpo, proveyendo inervación serotoninérgica local y funcionando como interneuronas, como se ha observado en los ganglios de otros invertebrados (Lillesaar & Gaspar, 2018; Vleugels, Verlinden, Vanden Broeck, 2015; Nichols, 2014; Azmitia, 2020). Sin embargo, ya que este receptor también puede expresarse postsinápticamente, la interpretación del origen de la síntesis de 5-HT podría ser opuesta a la anteriormente mencionada, siendo ésta proveída desde una sola fuente y produciendo inervación negativa a todas las estructuras del cerebro de estos animales. Dada cualquiera de las hipótesis, estudiar la organización del sistema serotoninérgico en los pulpos podría revelar información crucial para comprender el surgimiento de procesos cognitivos convergentes a través del funcionamiento de sistemas nerviosos complejos completamente diferentes al de los mamíferos (Azmitia, 2020; Kandel & Schwartz, 1982; Marois & Carew, 1997; Kristan & Nusbaum, 1982; Hochner, Shomrat & Fiorito, 2006). De esta manera, se requieren más estudios que profundicen en el tema, comprobando la expresión de 5-HT y del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en cada uno de los lóbulos anteriormente mencionados y diferenciando entre autoreceptores y receptores postsinápticos para comprender el efecto de la 5-HT en el sistema nervioso de los octópodos.

### 9.3. PROYECCIONES

En este estudio se mapeó por primera vez la presencia de 5-HT en el cerebro de *O. maya* y se identificó la primera evidencia de un receptor serotoninérgico en el sistema nervioso de los octópodos. Para comprobar estos resultados es necesario mejorar el control experimental de este estudio aumentando el número de tejidos evaluados en cada grupo y agregando un grupo de control positivo utilizando muestras de cerebro de rata, particularmente del NR y de la región CA3 del hipocampo. Por otro lado, también es necesario realizar el análisis visual y cuantitativo a partir de imágenes obtenidas utilizando un objetivo con ampliación 40x, en las que se pueda cuantificar la InFl de cada célula y describir su ubicación precisa dentro de cada estructura.

Posteriormente, se podría realizar una técnica de PCR-RT utilizando RNA de cada una de las estructuras evaluadas de *O. maya* y primers para 5-HT y el receptor 5-HT1A obtenidos a partir del genoma secuenciado de *Octopus bimaculoides* (Albertin, Simakov, Mitros, Wang, et al., 2015). De esta manera se corroboran tanto la existencia como la ubicación de 5-HT y su receptor 5-HT1A en el cerebro de *O. maya*. Para complementar estos resultados se podría realizar la misma técnica utilizando RNA de glándulas salivales y primers para la enzima Triptófano hidroxilasa seguido de una inmunohistoquímica de Tph de manera que sea posible determinar el lugar preciso de síntesis de 5-HT.

Por último, la identificación del receptor 5-HT1A en el sistema nervioso de los pulpos permite la implementación de manipulaciones farmacológicas del sistema serotoninérgico a través de agonistas selectivos de 5-HT1A como la Gepirona, 8-OH-DPAT o Buspirona; o antagonistas como el WAY 100135 o la Spiperona (Kumar, & Kishore, 2020). Acompañadas de evaluaciones electrofisiológicas y conductuales, pueden esclarecer si la participación de la 5-HT en los procesos fisiológicos o capacidades cognitivas asociadas a las estructuras anteriormente mencionadas es específica o si en realidad ésta ejerce su participación a través de la coordinación de la actividad general del cerebro (Hensler, 2012). De manera más específica, se pueden utilizar estos fármacos para evaluar los efectos de este receptor en la plasticidad sináptica, el aprendizaje y su papel en la memoria. Estas aproximaciones son de especial importancia, ya que se considera que para comprender el papel funcional de la 5-HT es necesario estudiar sus efectos a través de los

distintos niveles de organización de los organismos (Berger, Gray, & Roth, 2009; Marquez & Chacron, 2020).

## 10. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este estudio se identificó que, al igual que otros octópodos, *O. maya* presenta 5-HT en la mayoría de las estructuras de su cerebro, a excepción del ChP, Vas y Si. Ésta distribución semigeneralizada de la 5-HT en el cerebro del pulpo es consistente con la noción de que este neurotransmisor está implicado en prácticamente cualquier proceso autonómico y capacidad cognitiva de estos animales (Hensler, 2012). Aún más, se identificó también la presencia del receptor 5-HT1A cuya ubicación parece indicar una participación conservada del receptor en la integración de información, aprendizaje, memoria, y en la regeneración axonal, así como se ha visto que participa tanto en vertebrados como invertebrados. En función de su ubicación en las distintas estructuras del cerebro de *O. maya* se puede inferir su participación en la modulación de otros neurotransmisores y neuropéptidos en centros motores y de procesamiento sensorial; y en la regulación homeostática de funciones cardiovasculares como ritmo cardíaco, presión arterial y vasoconstricción. Por último, la presencia del receptor 5-HT1A en el complejo MSF-LV aporta a las similitudes entre estas estructuras y el hipocampo vertebrado, particularmente al CA3; y al mismo tiempo lo propone como un posible mecanismo subyacente a la plasticidad sináptica en el sistema nervioso del pulpo.

De manera concluyente, estos resultados concuerdan con la antigüedad filogenética de este receptor y su amplia distribución a través de las especies animales (Vleugels, Verlinden, Vanden Broeck, 2015; Sobrido-Camean, Celina Rodicio, & Barreiro-Iglesias, 2018; Azmitia, 2020). Además, esta es la primera evidencia de un posible mecanismo de acción de la 5-HT. La identificación de 5-HT y su receptor 5-HT1A en el cerebro de *O. maya*, propone una nueva vía de investigación del sistema serotoninérgico en pulpos a través de la utilización de fármacos selectivos de 5-HT1A. Además, postula a *O. maya*, como una especie adecuada para implementar manipulación farmacológica acompañada de evaluaciones conductuales en un modelo de cognición invertebrada.

Por otro lado, dadas las condiciones de este estudio, se requiere mayor investigación para corroborar los resultados obtenidos, identificar la fuente de la síntesis de 5-HT en el

organismo y corroborar el efecto particular que tiene sobre cada una de las estructuras a través de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>.

## 11. REFERENCIAS

- Alavi, S. M. H., Nagasawa, K., Takahashi, K. G., & Osada, M. (2017). Structure-Function of Serotonin in Bivalve Molluscs. Serotonin - A Chemical Messenger Between All Types of Living Cells. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69165>
- Albertin, C. B., Simakov, O., Mitros, T., Wang, Z. Y., Pungor, J. R., Edsinger-Gonzales, E., Brenner, S., Ragsdale, C. W., & Rokhsar, D. S. (2015). The octopus genome and the evolution of cephalopod neural and morphological novelties. *Nature*, *524*(7564), 220–224. <https://doi.org/10.1038/nature14668>
- Alkadhi, K. A. (2021). NMDA receptor-independent LTP in mammalian nervous system. *Progress in Neurobiology*, *200*(January), 101986. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2020.101986>
- Alupay, J. S., Hadjisolomou, S. P., & Crook, R. J. (2014). Arm injury produces long-term behavioral and neural hypersensitivity in octopus. *Neuroscience Letters*, *558*, 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.11.002>
- Amodio, P. & Fiorito, G. (2013). Observational and Other Types of Learning in Octopus. *Invertebrate Learning*. In Elsevier.
- Anderson, R. C., Mather, J. A., Monette, M. Q., & Zimsen, S. R. M. (2010). Octopuses (*Enteroctopus dofleini*) recognize individual humans. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, *13*(3), 261–272. <https://doi.org/10.1080/10888705.2010.483892>
- Andrade, R., & Haj-Dahmane, S. (2020). Cellular effects of serotonin in the CNS. In Handbook of The Behavioral Neurobiology of Serotonin (Vol. 31, pp. 279–288). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64125-0.00015-3>
- Athar, S. (2010). Serotonin and Tryptophan. Encyclopedia of Movement Disorders, 104–108. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374105-9.00001-0>
- Azmitia, Efrain C. "Evolution of serotonin: sunlight to suicide." Handbook of behavioral neuroscience. Vol. 31. Elsevier, 2020. 3-22.
- Bankhead, P. (2014). Analyzing fluorescence microscopy images with ImageJ. *ImageJ*, *1*(195), 10-1109.

- Baxter, D. A., Cataldo, E., & Byrne, J. H. (2013). Computational Analyses of Learning Networks. *Handbook of Behavioral Neuroscience*, 22, 69–80. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415823-8.00007-1>
- Bellier, J. P., Xie, Y., Farouk, S. M., Sakaue, Y., Tooyama, I., & Kimura, H. (2017). Immunohistochemical and biochemical evidence for the presence of serotonin-containing neurons and nerve fibers in the octopus arm. *Brain Structure and Function*, 222(7), 3043–3061. <https://doi.org/10.1007/s00429-017-1385-3>
- Berger, M., Gray, J. A., & Roth, B. L. (2009). The Expanded Biology of Serotonin. *Annual Review of Medicine*, 60(1), 355–366. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.60.042307.110802>
- Bertapelle C, Polese G, Di Cosmo A. (2017). Enriched environment increases PCNA and PARP1 levels in *Octopus vulgaris* central nervous system: first evidence of adult neurogenesis in Lophotrochozoa. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)*. 00B:1–13.
- Birch, J., Schnell, A. K., & Clayton, N. S. (2020). Dimensions of Animal Consciousness. In *Trends in Cognitive Sciences*(Vol. 24, Issue 10, pp. 789–801). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2020.07.007>
- Boal, J. G., Dunham, A. W., Williams, K. T., & Hanlon, R. T. (2000). Experimental evidence for spatial learning in octopuses (*Octopus bimaculoides*). *Journal of Comparative Psychology*, 114(3), 246–252. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.114.3.246>
- Borrelli, L., Chiandetti, C., & Fiorito, G. (2020). A standardized battery of tests to measure *Octopus vulgaris*' behavioural performance. *Invertebrate Neuroscience : IN*, 20(1), 4. <https://doi.org/10.1007/s10158-020-0237-7>
- Butler-Struben, H. M., Brophy, S. M., Johnson, N. A., & Crook, R. J. (2018). In vivo recording of neural and behavioral correlates of anesthesia induction, reversal, and euthanasia in cephalopod molluscs. *Frontiers in Physiology*, 9(FEB), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00109>
- Carhart-Harris, R. L., & Nutt, D. J. (2017). Serotonin and brain function: A tale of two receptors. *Journal of Psychopharmacology*, 31(9), 1091–1120. <https://doi.org/10.1177/0269881117725915>

- Cassel, J. C. (2020). The role of serotonin in learning and memory: a rich pallet of experimental studies. *Handbook of Behavioral Neuroscience*, 31, 549–570. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-6>
- Cohen, J. Y., & Grossman, C. D. (2020). Dorsal raphe serotonergic neurons regulate behavior on multiple timescales. In *Handbook of The Behavioral Neurobiology of Serotonin* (Vol. 31, pp. 521–529). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64125-0.00030-X>
- Commons, K. G. (2020). Serotonin system function, organization, and feedback. In *Handbook of The Behavioral Neurobiology of Serotonin* (Vol. 31, pp. 41–48). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64125-0.00003-7>
- Cortes-Altamirano, J. L., Olmos-Hernandez, A., Jaime, H. B., Carrillo-Mora, P., Bandala, C., Reyes-Long, S., & Alfaro-Rodríguez, A. (2018). Review: 5-HT1, 5-HT2, 5-HT3 and 5-HT7 Receptors and their Role in the Modulation of Pain Response in the Central Nervous System. *Current Neuropharmacology*, 16(2), 210–221. <https://doi.org/10.2174/1570159x15666170911121027>
- Cummings, D. F., Canseco, D. C., Sheth, P., Johnson, J. E., & Schetz, J. A. (2010). Synthesis and structure–affinity relationships of novel small molecule natural product derivatives capable of discriminating between serotonin 5-HT1A, 5-HT2A, 5-HT2C receptor subtypes. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 18(13), 4783–4792.
- Dan, S., Shibasaki, S., Takasugi, A., Takeshima, S., Yamazaki, H., Ito, A., & Hamasaki, K. (2021). Changes in behavioural patterns from swimming to clinging, shelter utilization and prey preference of East Asian common octopus *Octopus sinensis* during the settlement process under laboratory conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 539(February), 151537. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2021.151537>
- De Lisa, E., De Maio, A., Moroz, L. L., Moccia, F., Mennella, M. R. F., & Di Cosmo, A. (2012). Characterization of novel cytoplasmic PARP in the brain of *Octopus vulgaris*. *Biological Bulletin*, 222(3), 176–181. <https://doi.org/10.1086/BBLv222n3p176>



- Di Cosmo, A., & Polese, G. (2016). Neuroendocrine-immune systems response to environmental stressors in the cephalopod *Octopus vulgaris*. *Frontiers in Physiology*, 7(SEP), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00434>
- Di Cosmo, A., Maselli, V., & Polese, G. (2018). *Octopus vulgaris*: An Alternative in Evolution. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 65, 585–598. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-92486-1\\_26](https://doi.org/10.1007/978-3-319-92486-1_26)
- Di Cristina, G., Andrews, P., Ponte, G., Galligioni, V., & Fiorito, G. (2015). The impact of Directive 2010/63/EU on cephalopod research. *Invertebrate Neuroscience*, 15(4), 8.
- Di Giovanni, G., Chagraoui, A., Bharatiya, R., & De Deurwaerdère, P. (2020). Serotonergic control of excitability: from neuron to networks. In *Handbook of The Behavioral Neurobiology of Serotonin* (Vol. 31, pp. 197–215). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64125-0.00010-4>
- Di Poi, C., Darmaillacq, A. S., Dickel, L., Boulouard, M., & Bellanger, C. (2013). Effects of perinatal exposure to waterborne fluoxetine on memory processing in the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Aquatic Toxicology*, 132e133,84e91.
- Galindo, C. G., Hernández, F. A., & Santos, V. J. (2014). Pulpo del Golgo de México: *Octopus maya* y *Octopus vulgaris*. In *Sustentabilidad y Pesca Responsable en México: Evaluación y Manejo* (Issue April 2016, pp. 181–209).
- González-Navarrete, D. A. (2021). Etograma del pulpo maya rojo de cuatro ojos, *O. maya* (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hanlon, R. T., & Messenger, J. B. (2018). Cephalopod behaviour. In *Cephalopod behaviour*. [https://doi.org/10.1016/s0169-5347\(97\)82690-0](https://doi.org/10.1016/s0169-5347(97)82690-0)
- Hessling, E. (2017). Comparing the serotonergic system in vertebrates and invertebrates. [Tesis de licenciatura no publicada] Linköping University.
- Hochner, B. (2012). An embodied view of octopus neurobiology. *Current Biology*, 22, R887-R892.
- Hochner, B. & Shomrat, T. (2014). The neurophysiological basis of learning and memory in an advanced invertebrate: The octopus. In: A-S. Darmaillacq, L. Dickel & J. A. Mather (Eds.), *Cephalopod cognition* (pp. 72-93). Cambridge, UK: Cambridge University Press.

- Hochner, B., Shomrat, T., & Fiorito, G. (2006). The Octopus: A model for a comparative analysis of the evolution of learning and memory mechanisms. *Biological Bulletin*, 210(3), 308–317. <https://doi.org/10.2307/4134567>
- Huffard, C. L. (2007). Ethogram of *Abdopus aculeatus* (d'Orbigny, 1834) (Cephalopoda: Octopodidae): Can behavioural characters inform octopodid taxonomy and systematics? *Journal of Molluscan Studies*, 73(2), 185–193. <https://doi.org/10.1093/mollus/eym015>
- Huffard, C. L. (2013). Cephalopod neurobiology: An introduction for biologists working in other model systems. *Invertebrate Neuroscience*, 13(1), 11–18. <https://doi.org/10.1007/s10158-013-0147-z>
- Ibrahim, G. (2020). Fine structure of the central brain in the octopod *Eledone cirrhosa* (Lamarck, 1798) (Mollusca–Octopoda). *Invertebrate Neuroscience*, 20(3). <https://doi.org/10.1007/s10158-020-00250-6>
- Jeong, A. H., Hwang, J., Jo, K., Kim, S., Ahn, Y., Suh, H. J., & Choi, H. S. (2021). Fermented gamma aminobutyric acid improves sleep behaviors in fruit flies and rodent models. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7). <https://doi.org/10.3390/ijms22073537>
- Jones, L. A., Sun, E. W., Martin, A. M., & Keating, D. J. (2020). The ever-changing roles of serotonin. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 125, 105776. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2020.105776>
- Josef, N., & Shashar, N. (2019). Camouflage in benthic cephalopods: what does it teach us?. Cephalopod cognition. In *Current Biology* (Vol. 29, Issue 15). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.06.049>
- Juárez, O. E., López-Galindo, L., Pérez-Carrasco, L., Lago-Lestón, A., Rosas, C., Cosmo, A. Di, & Galindo-Sánchez, C. E. (2019). *Octopus maya* white body show sex-specific transcriptomic profiles during the reproductive phase, with high differentiation in signaling pathways. *PLoS ONE*, 14(5), 1–29. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216982>
- Kandel, E. R., Dudai, Y., & Mayford, M. R. (2014). The molecular and systems biology of memory. *Cell*, 157(1), 163–186. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.001>

- Kandel, E. R., & Schwartz, J. H. (1982). Molecular biology of learning: Modulation of transmitter release. *Science*, 218, 433e443
- Katz, I., Shomrat, T., & Neshet, N. (2021). Feel the light: sight-independent negative phototactic response in octopus arms. *The Journal of Experimental Biology*, 224. <https://doi.org/10.1242/jeb.237529>
- Kavalali ET (2015) The mechanisms and functions of spontaneous neurotransmitter release. *Nat Rev Neurosci* 16(1):5–16. Nature Publishing Group
- Kawashima, S., Takei, K., Yoshikawa, S., & Yasumuro, H. (2020). *Tropical Octopus Abdopus aculeatus Can Learn to Recognize Real and Virtual Symbolic Objects*. February, 12–24. <https://doi.org/10.1086/707420>
- Kito-Yamashita, T., Haga, C., Hirai, K., Uemura, T., Kondo, H., & Kosaka, K. (1990). Localization of serotonin immunoreactivity in cephalopod visual system. *Brain Research*, 521(1–2), 81–88. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91527-N](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91527-N)
- Kristan, W. B., Jr., & Nusbaum, M. P. (1982). The dual role of serotonin in leech swimming. *Journal de Physiologie*, 78, 743e747.
- Kuba, M., Gutnick, T., & Burghardt, G. (2014). Learning from play in octopus. In A. Darmaillacq, L. Dickel, & J. Mather (Eds.), *Cephalopod Cognition* (pp. 57-71). Cambridge: Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139058964.006>
- Kuba, M., Meisel, D. V., Byrne, R. A., Griebel, U., & Mather, J. A. (2003). Looking at play in *Octopus vulgaris*. *Berliner Paläontologische Abhandlungen*, 3, 163-169.
- Kuhn, D. M., & Hasegawa, H. (2020). Tryptophan hydroxylase and serotonin synthesis regulation. In *Handbook of The Behavioral Neurobiology of Serotonin* (Vol. 31, pp. 239–256). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64125-0.00012-8>
- Kumar, P., Abed, S.N., Bataineh, Y.A., & Salem, M.S. (2020). Neurotransmitters and Their Receptors: State of the Art. In *Frontiers in Pharmacology of Neurotransmitters*. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-3556-7>
- Laws, R. M. (1980). Aminergic Fluorescence In The Cephalopod Brain. *The Royal Society Of London*, 291(B 1046), 127–145.
- Lillesaar, C., & Gaspar, P. (2018). Serotonergic neurons in vertebrate and invertebrate model organisms (Rodents, zebrafish, *drosophila melanogaster*, *aplysia californica*,

- caenorhabditis elegans*). In Serotonin: The Mediator that Spans Evolution (pp. 49–80). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800050-2.00003-6>
- Marin, P., Bécamel, C., Chaumont-Dubel, S., Vandermoere, F., Bockaert, J., & Claeysen, S. (2020). Classification and signaling characteristics of 5-HT receptors: toward the concept of 5-HT reeptosomes. In Handbook of The Behavioral Neurobiology of Serotonin (Vol. 31, pp. 91–120). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64125-0.00005-0>
- Marini, G., De Sio, F., Ponte, G., & Fiorito, G. (2017). Behavioral Analysis of Learning and Memory in Cephalopods. In Learning and Memory: A Comprehensive Reference (Second Edi, Vol. 1). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809324-5.21024-9>
- Marois, R., & Carew, T. J. (1997). Ontogeny of serotonergic neurons in *Aplysia californica*. *Journal of Comparative Neurology*, 386, 477e490.
- Marquez, M. M., & Chacron, M. J. (2020). Serotonin and sensory processing. In Handbook of The Behavioral Neurobiology of Serotonin (Vol. 31, pp. 449–459). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64125-0.00025-6>
- Martin, A. M., Young, R. L., Leong, L., Rogers, G. B., Spencer, N. J., Jessup, C. F., & Keating, D. J. (2017). The diverse metabolic roles of peripheral serotonin. *Endocrinology*, 158(5), 1049–1063. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1839>
- Martin, R., & Barlow, J. (1972). Localisation of monoamines in nerves of the posterior salivary gland and salivary centre in the brain of Octopus. *Zeitschrift Für Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie*, 125(1), 16–30. <https://doi.org/10.1007/BF00306839>
- Maselli, V., Al-Soudy, A. S., Buglione, M., Aria, M., Polese, G., & Di Cosmo, A. (2020). Sensorial hierarchy in *octopus vulgaris*'s food choice: Chemical vs. Visual. *Animals*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/ani10030457>
- Mather, J. A. (1988). Daytime activity of juvenile *Octopus vulgaris* in Bermuda. *Malacologia*, 29(1), 69-76.
- Mather, J. A., & Alupay, J. S. (2016). An ethogram for benthic octopods (Cephalopoda: Octopodidae). *Journal of Comparative Psychology*, 130(2), 109–127. <https://doi.org/10.1037/com0000025>

- Mather, J. A., & Dickel, L. (2017). Cephalopod complex cognition. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 16, 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2017.06.008>
- Mather, J. A., & Kuba, M. J. (2018). *Octopuses – Mind in the Waters*. In *Field and Laboratory Methods in Animal Cognition* (pp. 308–328). <https://doi.org/10.1017/9781108333191.016>
- Matus, A. I. (1973). Histochemical localization of biogenic monoamines in the cephalic ganglia of *Octopus vulgaris*. *Tissue and Cell*, 5(4), 591–601. [https://doi.org/10.1016/S0040-8166\(73\)80048-5](https://doi.org/10.1016/S0040-8166(73)80048-5)
- Meisel, D. V., Kuba, M., Byrne, R. A., & Mather, J. (2013). The effect of predatory presence on the temporal organization of activity in *Octopus vulgaris*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 447, 75–79. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2013.02.012>
- Messenger, J. B. (1996). Neurotransmitters of cephalopods. *Invertebrate Neuroscience*, 2(2), 95–114. <https://doi.org/10.1007/BF02214113>
- Meunier, C. N., Chameau, P., & Fossier, P. M. (2017). Modulation of synaptic plasticity in the cortex needs to understand all the players. *Frontiers in synaptic neuroscience*, 9, 2.
- Moguel, C., Mascaró, M., Avila-Poveda, O. H., Caamal-Monsreal, C., Sanchez, A., Pascual, C., & Rosas, C. (2010). Morphological, physiological and behavioral changes during post-hatching development of *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda) with special focus on the digestive system. *Aquatic Biology*, 9(1), 35–48. <https://doi.org/10.3354/ab00234>
- Moutkine, I., Collins, E. L., Béchade, C., & Maroteaux, L. (2019). Evolutionary considerations on 5-HT<sub>2</sub> receptors. *Pharmacological Research*, 140(September 2018), 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.09.014>
- Muma, N. A., & Kapadia, K. (2020). Serotonylation and neuronal function. In *Handbook of The Behavioral Neurobiology of Serotonin* (Vol. 31, pp. 257–265). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64125-0.00013-X>
- Nichols, C. D. (2014). Serotonin. *Encyclopedia of the Neurological Sciences*, 4, 145–147. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385157-4.00048-8>

- Noyola Regil, J., Mascaro, M., Díaz, F., Denisse Re, A., Sánchez-Zamora, A., Caamal-Monsreal, C., & Rosas, C. (2015). Thermal biology of prey (*Melongena corona bispinosa*, *Strombus pugilis*, *Callinectes similis*, *Libinia dubia*) and predators (*Ocyurus chrysurus*, *Centropomus undecimalis*) of *Octopus maya* from the Yucatan Peninsula. *Journal of Thermal Biology*, 53(2015), 151–161. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2015.11.001>
- Nummenmaa, L., Seppälä, K., & Putkinen, V. (2020). Molecular imaging of the human emotion circuit.
- O'Brien, C. E., Ponte, G., & Fiorito, G. (2019). Octopus. *Encyclopedia of Animal Behavior*, 142–148. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.90074-8>
- Pavlova, I. V., & Rysakova, M. P. (2018). Effects of Administration of Serotonin 5-HT1A Receptor Ligands into the Amygdala on the Behavior of Rats with Different Manifestations of Conditioned Reflex Fear. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 48(3), 267–278. <https://doi.org/10.1007/s11055-018-0560-1>
- Perez, P. V., Butler-Struben, H. M., & Crook, R. J. (2017). The selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine increases spontaneous afferent firing, but not mechanonociceptive sensitization, in octopus. *Invertebrate Neuroscience*, 17(4), 1–5. <https://doi.org/10.1007/s10158-017-0203-1>
- Pech-Puch, D., Cruz-López, H., Canche-Ek, C., Campos-Espinosa, G., García, E., Mascaro, M., Rosas, C., Chávez-Velasco, D., & Rodríguez-Morales, S. (2016). Chemical tools of *octopus maya* during crab predation are also active on conspecifics. *PLoS ONE*, 11(2), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148922>
- Pettigrew, D. B., Smolen, P., Baxter, D. A., & Byrne, J. H. (2005). Dynamic properties of regulatory motifs associated with induction of three temporal domains of memory in aplysia. *Journal of Computational Neuroscience*, 18, 163e181.
- Ponte G., & Fiorito G. (2015) Immunohistochemical Analysis of Neuronal Networks in the Nervous System of *Octopus vulgaris*. In: Merighi A., Lossi L. (eds) Immunocytochemistry and Related Techniques. *Neuromethods*, vol 101. Humana Press, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2313-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2313-7_3)

- Prank, R., Wilson, D. R., & Harcourt, R. (2010). Video playback demonstrates episodic personality in the gloomy octopus. *Journal of Experimental Biology*, 213(7), 1035–1041. <https://doi.org/10.1242/jeb.040675>
- Roper, C. F. E., Sweeney, M. J., & Nauen, C. E. (1984). Cephalopods of the world: an annotated and illustrated catalogue of species of interest to fisheries. FAO Species Catalogue, vol. 3. In FAO Fish. Synop (Vol. 125, Issue 3).
- Shigeno, S., Andrews, P. L. R., Ponte, G., & Fiorito, G. (2018). Cephalopod brains: An overview of current knowledge to facilitate comparison with vertebrates. *Frontiers in Physiology*, 9(JUL), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00952>
- Shigeno, S., & Ragsdale, C. W. (2015). The gyri of the octopus vertical lobe have distinct neurochemical identities. *Journal of Comparative Neurology*, 523(9), 1297–1317. <https://doi.org/10.1002/jcomp.1297>
- Shomrat, T., Feinstein, N., Klein, M., & Hochner, B. (2010). Serotonin is a facilitatory neuromodulator of synaptic transmission and “reinforces” long-term potentiation induction in the vertical lobe of *Octopus vulgaris*. *Neuroscience*, 169(1), 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.04.050>
- Simões, N., Mascaró, M., Portela, E., & Rosas, C. (2014). Can preference for crabs in juvenile *Octopus maya* be modified through early experience with alternative prey? *Behaviour*, 151(11), 1597–1616. <https://doi.org/10.1163/1568539X-00003206>
- Sobrido-Camean, D., Celina Rodicio, M., & Barreiro-Iglesias, A. (2018). Serotonin controls axon and neuronal regeneration in the nervous system: Lessons from regenerating animal models. *Neural Regeneration Research*, 13(2), 237–238. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.226387>
- Schnell, A. K., & Clayton, N. S. (2019). Cephalopod cognition. *Current Biology*, 29(15), R726–R732. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.06.049>
- Schnell, A. K., & Clayton, N. S. (2021). Cephalopods: Ambassadors for rethinking cognition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.12.062>
- Tanner, A. R., Fuchs, D., Winkelmann, I. E., Gilbert, M. T. P., Pankey, M. S., Ribeiro, Â. M., ... & Vinther, J. (2017). Molecular clocks indicate turnover and diversification

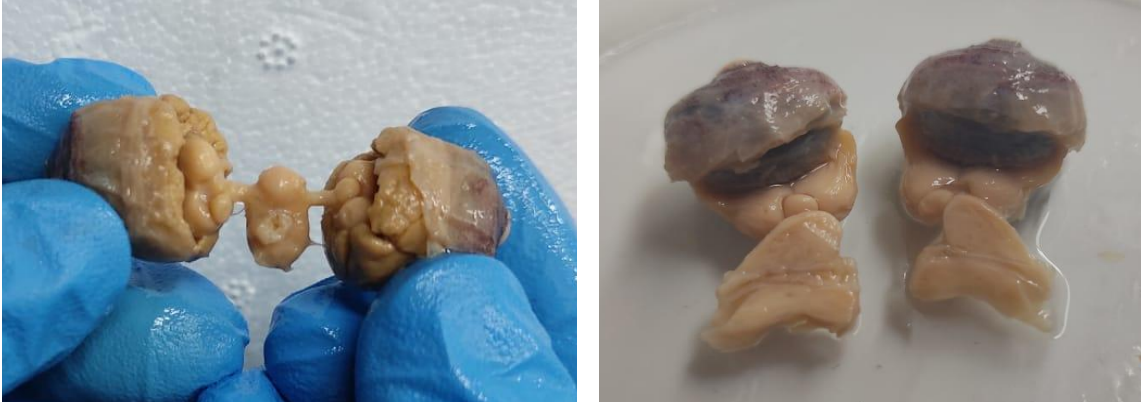
- of modern coleoid cephalopods during the Mesozoic Marine Revolution. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1850), 20162818.
- Tansey, E. M. (1980). Aminergic Fluorescence In The Cephalopod Brain. The Royal Society Of London, 291(B 1046), 127–145.
- Tricarico, E., Borrelli, L., Gherardi, F., & Fiorito, G. (2011). I know my neighbour: Individual recognition in *octopus vulgaris*. *PLoS ONE*, 6(4), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018710>
- Uemura, T., Yamashita, T., Haga, C., Miyazaki, N., Kondo, H., & Matsushita, M. (1987). Localization of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of *Octopus vulgaris* by immunohistochemistry. *Brain Research*, 406(1–2), 73–86. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)90770-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)90770-0)
- Van Heukelem, W. F. (1976). Growth, bioenergetics and life-span of *Octopus cynea* and *Octopus maya*.
- Vidal, E. A. . (2014). Advances in Marine Biology. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (1st ed., Vol. 67). Elsevier. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Vilaró, M. T., Cortés, R., Mengod, G., & Hoyer, D. (2020). Distribution of 5-HT receptors in the central nervous system: an update. In *Handbook of The Behavioral Neurobiology of Serotonin* (Vol. 31, pp. 121–146). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64125-0.00006-2>
- Vitti, J. J. (2013). Cephalopod Cognition in an Evolutionary Context: Implications for Ethology. *Biosemitotics*, 6(3), 393–401. <https://doi.org/10.1007/s12304-013-9175-7>
- Vleugels R, Verlinden H, & Vanden Broeck J. (2015). Serotonin, serotonin receptors and their actions in insects. *Neurotransmitter*. 2. 1.
- Voss, G. L., & Solis Ramírez, M. (1966). *Octopus maya*, A New Species From The Bay Of Campeche, Mexico. *Bulletin of Marine Science*, 16(3).
- Walker, J. J., Longo, N., & Bitterman, M. E. (1970). The octopus in the laboratory. Handling, maintenance, training. *Behavior Research Methods & Instrumentation*, 2(1), 15–18. <https://doi.org/10.3758/BF03205718>



- Wang, Z. Y., Ragsdale, C. W., Wang, Z. Y., & Ragsdale, C. W. (2019). Cephalopod Nervous System Organization. Oxford Research Encyclopedia of Neuroscience, June 2020, 1–22. <https://doi.org/10.1093/acrefore/9780190264086.013.181>
- Wells, M. J., & Young, J. Z. (1969). Learning at different rates of training in the octopus. *Animal Behaviour*, 17(PART 3), 406–415. [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(69\)90140-7](https://doi.org/10.1016/0003-3472(69)90140-7)
- Wollesen, T., Sukhsangchan, C., Seixas, P., Nabhitabhata, J., & Wanninger, A. (2012). Analysis of neurotransmitter distribution in brain development of benthic and pelagic octopod cephalopods. *Journal of Morphology*, 273(7), 776–790. <https://doi.org/10.1002/jmor.20023>
- Yaguchi, S., & Katow, H. (2003). Expression of tryptophan 5-hydroxylase gene during sea urchin neurogenesis and role of serotonergic nervous system in larval behavior. *Journal of Comparative Neurology*, 466, 219e229.
- Young, J. Z. (1963). the Number and Sizes of Nerve Cells in *Octopus*. Proceedings of the Zoological Society of London, 140(2), 229–254. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1963.tb01862.x>
- Zarella, I., Ponte, G., Baldascino, E., & Fiorito, G. (2015). Learning and memory in *Octopus vulgaris*: A case of biological plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, 35(i), 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.06.012>
- Zylinski, S. & Johnsen, S. (2019). Visual cognition in deep-sea cephalopods: what we don't know and why we don't know it. Cephalopod cognition. In *Current Biology* (Vol. 29, Issue 15). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.06.049>

## 12. ANEXOS

### *Anexo 1. Obtención del tejido*



### *Anexo 2. Protocolo de Inmunomarcaje*

#### **Precalentar**

1. Precalentar el autoclave a 60°C durante 15 min, confirmar con termómetro

#### **Marcar**

1. Seleccionar laminillas a utilizar y marcar con lápiz

#### **Desparafinar**

1. Acomodar laminillas en el mismo carril de la canastilla y colocar horizontalmente dentro del horno
2. Calentar el tejido en el autoclave a 60°C durante 2 hrs

#### **Preparar 500 ml Buffer de Citratos**

1. Verter 300 ml de agua destilada en un vaso de precipitado de 1L
2. Agregar 12.85 g de Citrato de sodio
3. Agregar 1.211 g de Ácido Cítrico
4. Agregar agua destilada hasta obtener 500 ml
5. Verter en recipiente de tinción y tapar
6. Conservar en el refrigerador a 4°C

#### **Preparar Etanol y Xilol**

1. Preparar 350 ml de cada concentración [100, 95, 80, 70, 60]
2. Verter cada uno en un pozo de tinción individual y tapar

3. Verter Xilol en 2 pozos de tinción individual y tapar

**Preparar 350 ml de Permeabilizante**

Tween 20 [1:50 o 0.2%] en PBS

1. Apagar luces
2. Cubrir un recipiente de tinción con aluminio
3. Agregar 7 ml de Tween 20 con micropipeta en 250 ml de PBS en un vaso de precipitado
4. Aforar con PBS hasta obtener 350 ml
5. Verter en recipiente de tinción protegido de luz

**Preparar 350 ml de Bloqueador**

Serum equino [1:20 o 5%] + Tween 20 [1:1000 o 0.1%] en PBS.

1. Agregar 17.5 ml de Serum equino a 300 ml de PBS en un un vaso de precipitado
2. Tomar y agregar 350  $\mu$ l de Tween 20 con micropipeta de transferencia
3. Aforar hasta obtener 350 ml
4. Verter en recipiente de tinción y tapar

**Rehidratación de tejidos**

1. Sacar tejidos del horno y meter a Xilol I durante 7 min  
*Meter Buffer de Citratos al horno y subir temperatura a 90°C, usar termómetro para corroborar*
2. Meter canastilla al Xilol II durante 5 min
3. Sumergir en etanol 96% y sacar lentamente. Repetir 10 veces y retirar.
4. Sumergir en etanol 80% y sacar lentamente. Repetir 5 veces y retirar.
5. Sumergir en etanol 70% y sacar lentamente. Repetir 5 veces y retirar.
6. Sumergir en etanol 60% y sacar lentamente. Repetir 5 veces y retirar.
7. Sumergir en agua destilada y sacar lentamente. Repetir 5 veces y retirar.

**Recuperación de antígeno**

1. Meter tejidos dentro del buffer de citratos y calentar a 90°C durante 15 min
2. Corroborar que las laminillas tengan pequeñas burbujas

**Permeabilizar**

1. Apagar la luz
2. Sumergir tejidos en permeabilizador durante 20 min en agitación y protegido de la luz
3. Verter PBS en recipiente de tinción
4. Hacer 3 lavados con PBS y agitación durante 5 min dentro del recipiente de tinción

**Bloquear**

1. Sumergir los tejidos en el bloqueador durante 1 hr dentro del recipiente de tinción de vidrio
2. Cubrir frasco con aluminio

*Preparar cámara húmeda con tiras de sanita en el fondo de cada carril y marcar el espacio donde irá cada grupo de anticuerpo y sus controles*

**Preparar anticuerpo primario**

Se utilizan 200 uL por laminilla con 2 cortes cada una

**Anti-5HT** → S5545-25UL [1 µg/ml] + Tween 20 [1:160 o 0.1%] en PBS

**Anti-5HT1a** → AB85615 [5 µg/ml] en PBS

1. Sacar anticuerpos del congelador y poner sobre bloque de hielo
2. Marcar un tubo de PCR de 5ml con 5HT y otro con 5HT1A
3. Agregar 2 ml de PBS con micropipeta de transferencia a cada tubo
4. Vortexear ligeramente el anticuerpo Anti-5ht
5. Agregar 2 µL con micropipeta de transferencia a los 2 ml de PBS en tubo de PCR
6. Vortexear ligeramente el anticuerpo Anti-5HT1a
7. Agregar 10 µL con micropipeta de transferencia a los 2 ml de PBS en tubo de PCR
8. Vortexear los anticuerpos diluidos

#### **Inmunomarcaje Primario**

1. Colocar laminillas en su respectivo lugar dentro de la cama húmeda y cerrar
2. Agregar 200µl de anticuerpo Anti-5ht con micropipeta a cada una de las laminillas correspondientes, asegurando no desbordar el líquido y omitiendo el control
3. Agregar 200µl de anticuerpo Anti-5HT1a con micropipeta a cada una de las laminillas correspondientes, asegurando no desbordar el líquido y omitiendo el control
4. Agregar PBS a las laminillas control
5. Cerrar cámara húmeda y tapar completamente la caja con aluminio
6. Incubar durante toda la noche a 4°C

#### **Lavado**

1. Retirar cámara húmeda de refrigeración
2. Agregar 200µl del PBS a cada laminilla y lavar durante 5 min
3. Repetir 3 veces
4. Retirar PBS

#### **Preparar anticuerpo secundario**

Se utilizan 200 µL por laminilla con 2 cortes cada una

**Goat anti-rabbit IgG** [2 µg/ml]

1. Tomar 1 tubo de 10ml y cubrirlo con papel aluminio
2. Agregar 4 ml de PBS al tubo
3. Apagar luces
4. Sacar anticuerpo secundario Goat anti-rabbit IgG del refrigerador
5. Vortexear ligeramente el anticuerpo
6. Agregar 8 µL a los 4 ml de PBS
7. Vortexear el anticuerpo diluido

#### **Inmunomarcaje Secundario**

1. Agregar 200µl de anticuerpo secundario con micropipeta a cada una de las laminillas

2. Tapar completamente la caja con aluminio
3. Incubar durante 1 hr en oscuridad

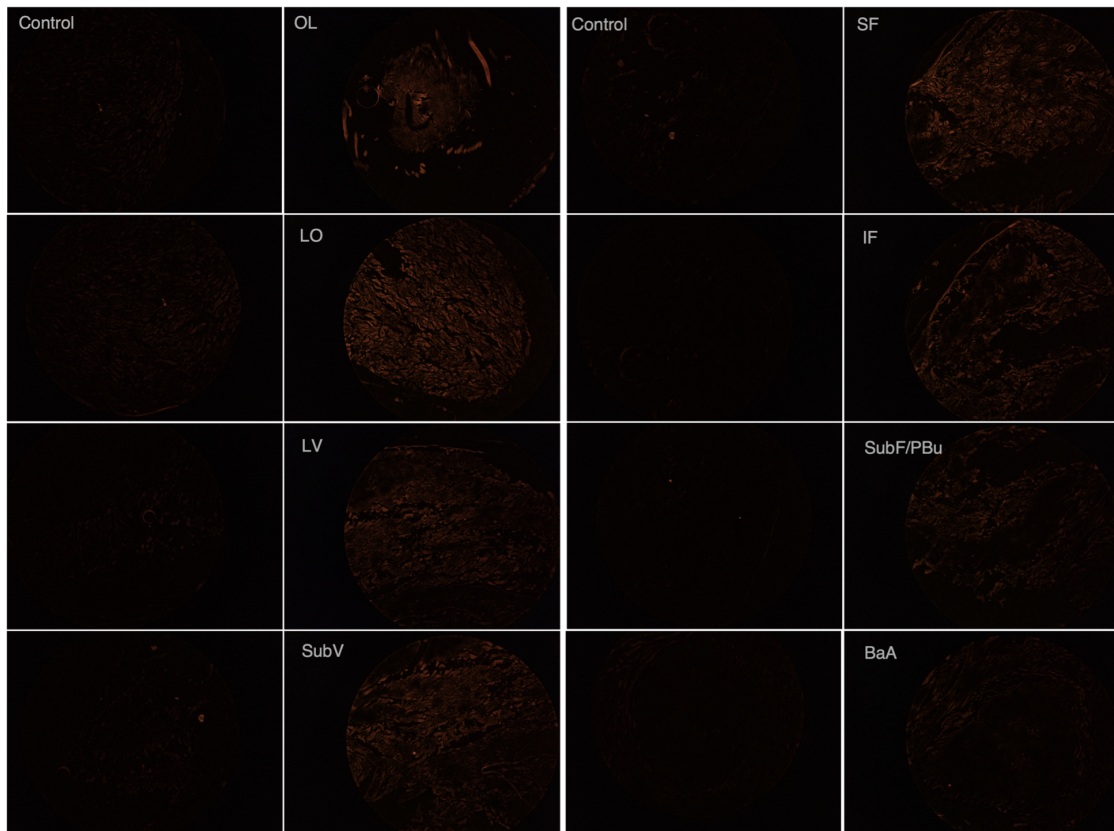
**Lavado**

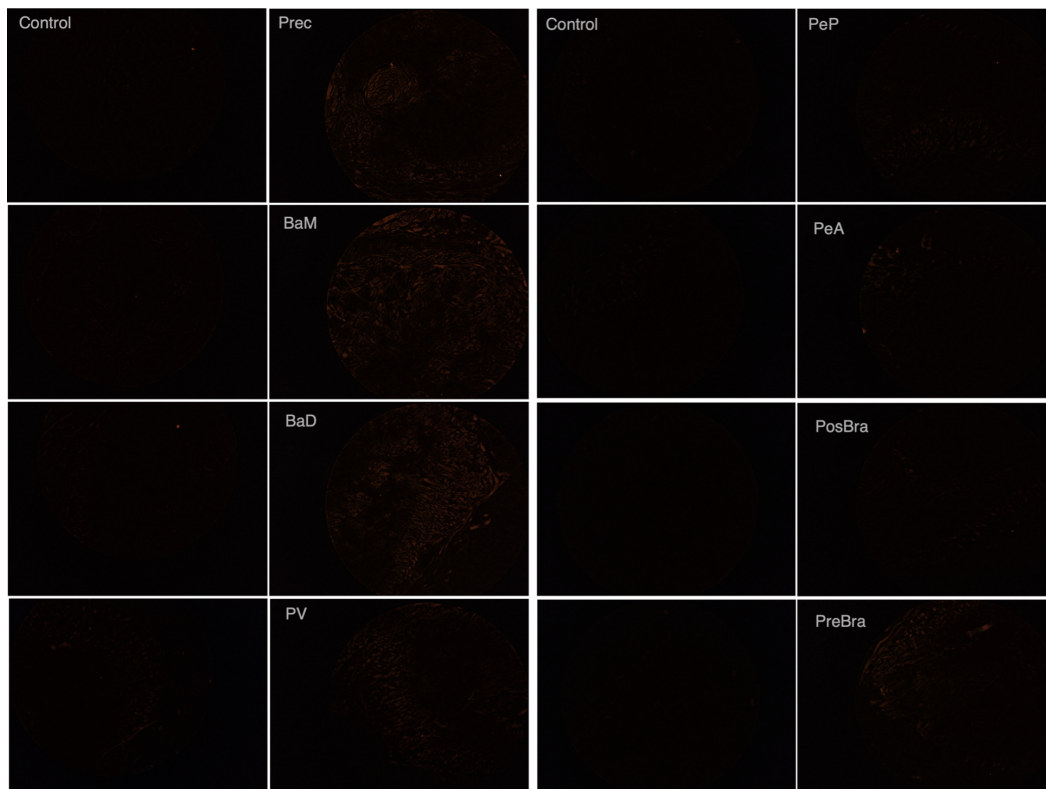
1. Agregar 200 $\mu$ l del PBS a cada laminilla y lavar durante 5 min en agitación y oscuridad
2. Repetir 3 veces
3. Retirar PBS
4. Tapar completamente la muestra con aluminio

**Montado**

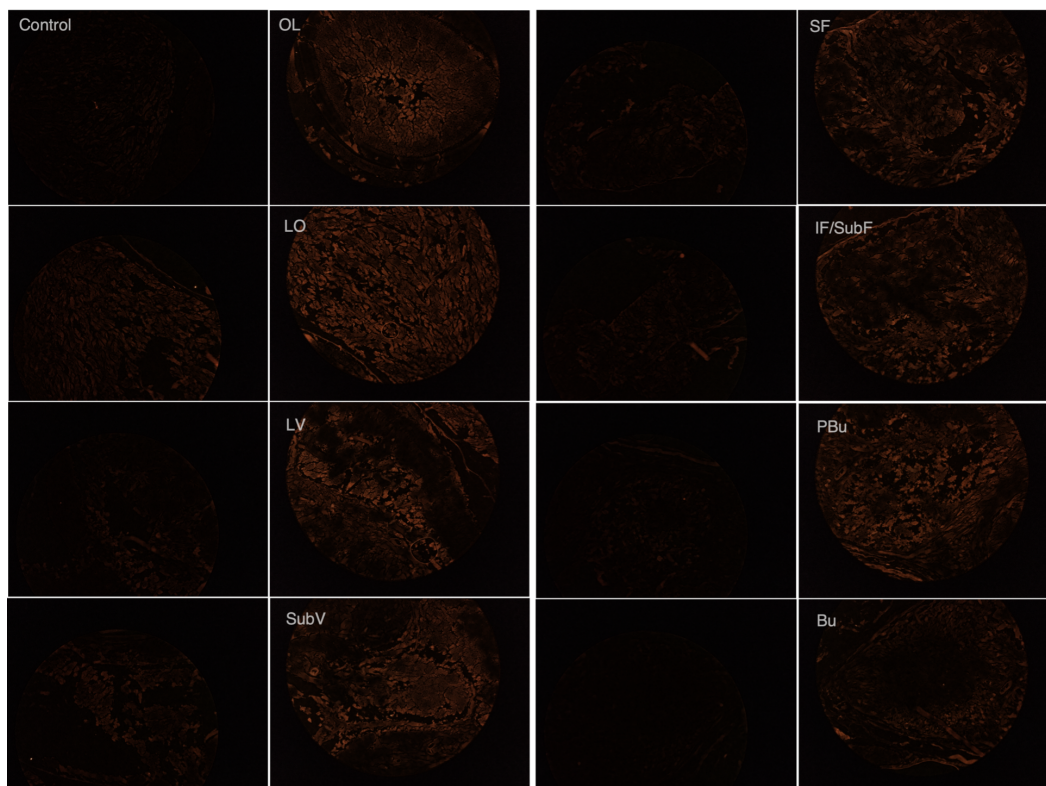
1. Retirar exceso de líquido de la laminilla
2. Agregar fluoromount sobre el tejido y cubrir con cubreobjetos
3. Sellar orillas con esmalte para uñas
4. Conservar protegido de la luz a 4° C hasta observación

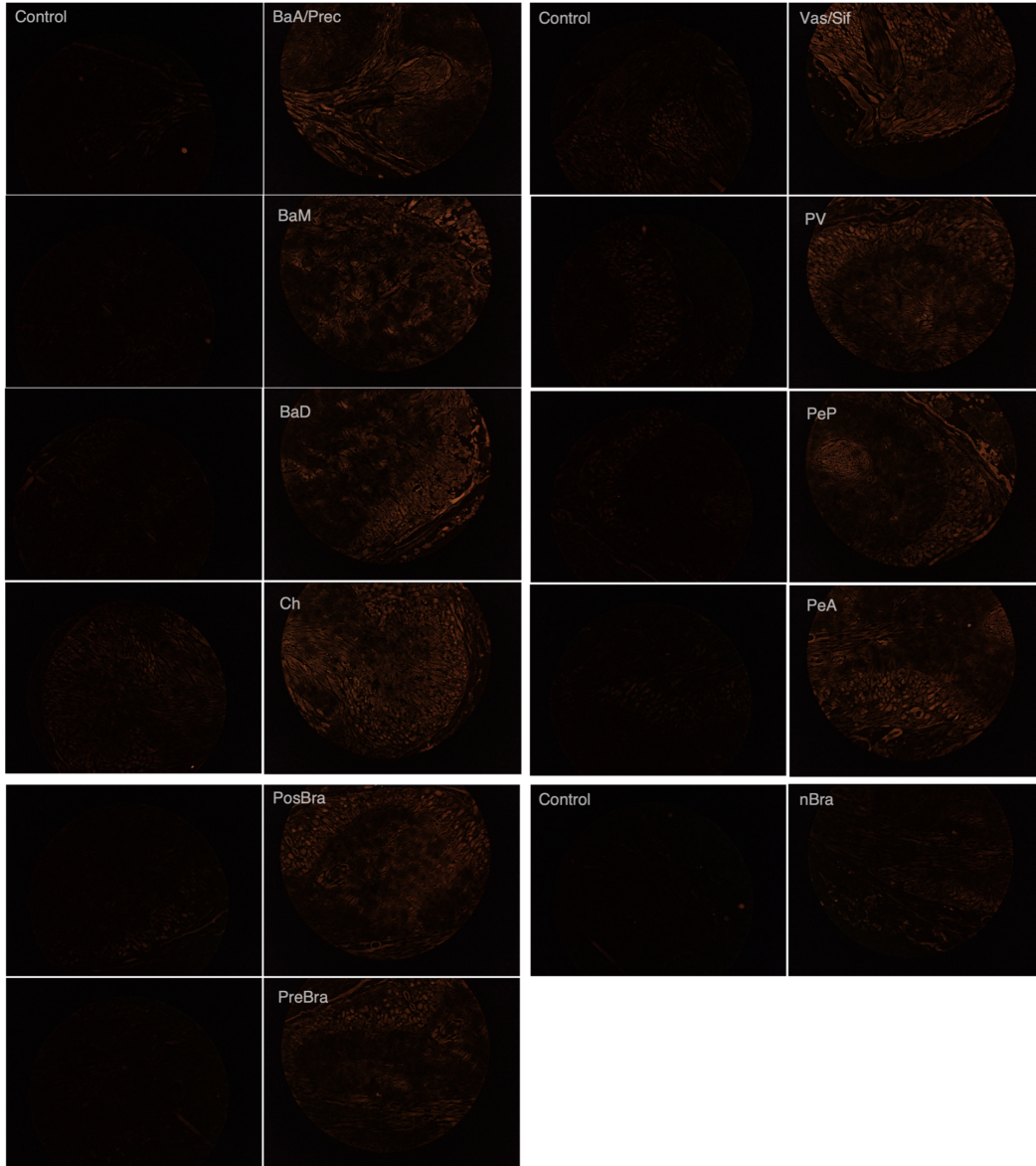
*Anexo 3. Imágenes de los grupos 5-HT posterior a la sustracción de fondo (N=1)*





*Anexo 4. Imágenes de los grupos 5-HT1A posterior a la sustracción de fondo (N=1)*





Anexo 5. Intensidad de Brillo y Coeficiente de Fluorescencia tipo 5-HT y 5-HT1A

