



**FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
MENCION NEUROCIENCIA**

**EVALUACIÓN DEL TRANSPORTADOR DE SEROTONINA COMO
MODERADOR DEL EFECTO DEL EJERCICIO VOLUNTARIO
SOBRE LA MEMORIA EPISÓDICA EN RATONES**

RICARDO ILLESCA MATUS

Tesis para optar al grado de

Magíster en Ciencias Biológicas Mención Neurociencia

Director de Tesis:

Dr. Pablo Moya

Universidad de Valparaíso

2019

FINANCIAMIENTOS

Esta tesis se llevó a cabo gracias al financiamiento de:

- Núcleo Milenio NUMIND, Biología de las Enfermedades Neuropsiquiátricas
- Beca CONICYT de Magíster para Profesionales de la Educación 2016
- Programa de Magíster en Ciencias Biológicas mención Neurociencia, Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso

INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	6
ABREVIATURAS.....	7
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.....	8
RESUMEN.....	9
SUMMARY.....	10
I. INTRODUCCION.....	11
1. Memoria episódica.....	11
1.2. Estructuras cerebrales involucradas en la memoria episódica.....	13
1.2.1 Hipocampo.....	13
1.2.2 Región Parahipocampal.....	13
1.2.3 Corteza Prefrontal.....	14
1.3 Integración de la información.....	15
2. Sistema serotoninérgico.....	16
2.1 Biosíntesis de serotonina.....	16
2.2 Receptores de serotonina.....	17
2.3 Proyección y neurotransmisión serotoninérgica Rafe-Hipocampo.....	17
2.4 Transportador de serotonina.....	18
3. Sistema serotoninérgico y memoria episódica.....	19
4. Ejercicio y memoria episódica.....	20
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
III. HIPOTESIS.....	24
IV. OBJETIVOS.....	24
Objetivo general.....	24
Objetivos específicos.....	24
V. METODOLOGIA.....	25
1. Bienestar animal.....	25
2. Animales de experimentación.....	25
3. Diseño experimental.....	26
4. Protocolo de ejercitación voluntaria.....	27

4.1 Rueda de ejercicio voluntario en ratones.....	27
4.2 Especificaciones técnicas rueda de ejercitación.....	28
5. Protocolo Test de localización de objetos y reconocimiento de objetos.....	29
5.1 Test de localización de objetos (LOR).....	30
5.2 Test de reconocimiento de objetos (NOR).....	30
6. Actividad locomotora y conductas tipo ansiosas.....	32
6.1 Open Field Test.....	32
VI. ANALISIS ESTADISTICO.....	33
VII. RESULTADOS.....	34
1. Distancia total protocolo de ejercitación.....	34
2. Distancia por día protocolo de ejercitación.....	35
3. Velocidad por día protocolo de ejercitación.....	36
4. Sesiones totales protocolo de ejercitación.....	37
5. Sesiones por día protocolo de ejercitación.....	38
6. Tiempo total sobre la rueda protocolo de ejercitación.....	39
7. Tiempo por día sobre la rueda protocolo de ejercitación.....	40
8. Distancia semanal recorrida en protocolo de ejercitación.....	41
9. Actividad locomotora Open Field Test.....	43
10. Tiempo en el centro Open Field Test.....	44
11. Frecuencia en el centro Open Field Test.....	45
12. LOR Tiempo objeto inmóvil.....	46
13. LOR Tiempo objeto trasladado.....	47
14. LOR Tiempo de exploración total.....	48
15. LOR ID.....	49
16. NOR Tiempo objeto familiar.....	50
17. NOR Tiempo objeto cambiado.....	51
18. NOR Tiempo de exploración total.....	52
19. NOR ID.....	53
VIII. DISCUSION.....	54
1. Efecto del ejercicio voluntario en la actividad locomotora de genotipos SERT.....	54
2. Efecto del ejercicio voluntario en las conductas tipo ansiosas de genotipos SERT.....	55

3. Mediciones del ejercicio voluntario en los genotipos SERT.....	56
4. Efectos del ejercicio voluntario en el test LOR entre genotipos SERT.....	57
5. Efectos del ejercicio voluntario en el test NOR entre genotipos SERT.....	58
IX. CONCLUSIONES.....	59
X. BIBLIOGRAFIA.....	60
XI. FIGURAS Y TABLAS.....	68

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Luis Illesca e Ivonne Matus, por educarme con amor, principios y valores, por dedicar sus vidas a fomentar y apoyar las actividades que cultivan mi felicidad. A mis hermanos, Esteban, Benjamín e Isidora de quienes debo, el saber el infinito amor que puede sentir mi corazón. A mi abuela Clemira (QEPD), de quién aprendí que la bondad no tiene límite pues la practicó con esmero, y de quién debo la promesa de ser cada día un mejor profesor. A mi abuela Etelvina, por quererme, a pesar de la distancia, desde el canto del gallo hasta el crepúsculo en su campo araucano. A mi tutor Dr. Pablo Moya, por apoyarme y guiarme hasta en las más difíciles circunstancias adversas. Por último, a Nicolás Ardiles y Hernán Álvarez, que son un regalo de la vida y que nunca sabrán lo importante que ha sido para mí su incondicional amistad verdadera.

TABLA DE ABREVIATURAS

5-HIAA	5-hidroxi-indolacético
5-HT	Serotonina
5-HTP	5-hidroxitriptofano
AD	Enfermedad de Alzheimer
CRF	Cardiorespiratory Fittnes
GABA	Ácido γ -aminobutírico
ID	Índice de discriminación
ISRS	Inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina
LOR	Location Object Recognition
MAO	Monoamina Oxidasa Mitocondrial (MAO)
NRD	Núcleo del Rafe Dorsal
NRM	Núcleo del Rafe Medio
NOR	Novel Object Recognition
RAVLT	Rey Auditory Verbal Learning Test
SERT	Transportador de serotonina
SERT HZ	SERT Heterocigotos
SERT KO	SERT Knock-out
SERT WT	SERT Wild Type
SPN	Semanas post natales

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1: Regiones cerebrales involucradas en la memoria episódica en roedores.....	68
Figura 2: Circuito neural subyacente a la memoria episódica en roedores.....	68
Figura 3: Proyecciones Serotoninérgicas del Núcleo Dorsal y Medial del Rafe.....	69
Figura 4: Línea temporal de los experimentos.....	26
Figura 5: Rueda de ejercicio voluntario.....	69
Figura 6: Protocolo Novel Object Recognition and Location Object Recognition.....	70
Figura 7. Protocolo de ejercitación. Distancia recorrida total.....	34
Figura 8. Protocolo de ejercitación. Distancia recorrida por día.....	35
Figura 9. Protocolo de ejercitación. Velocidad por día.....	36
Figura 10. Protocolo de ejercitación. Sesiones totales.....	37
Figura 11. Protocolo de ejercitación. Sesiones por día.....	38
Figura 12. Protocolo de ejercitación. Tiempo total sobre la rueda.....	39
Figura 13. Protocolo de ejercitación. Tiempo por día sobre la rueda.....	40
Figura 14 y 15. Protocolo de ejercitación. Distancia semanal recorrida.....	41
Figura 16. Efecto del ejercicio voluntario en la distancia recorrida en el OFT.....	43
Figura 17. Efecto del ejercicio voluntario en el tiempo en el centro en el OFT.....	44
Figura 18. Efecto del ejercicio voluntario en la frecuencia en el centro del OFT.....	45
Figura 19. LOR Tiempo de exploración en el objeto inmóvil.....	46
Figura 20. LOR Tiempo de exploración en el objeto trasladado.....	47
Figura 21. LOR Tiempo de exploración total.....	48
Figura 22. LOR Índice de Discriminación.....	49
Figura 23. NOR Tiempo de exploración en el objeto familiar.....	50
Figura 24. NOR Tiempo de exploración en el objeto novedoso.....	51
Figura 25. NOR Tiempo de exploración total.....	52
Figura 26. NOR Índice de Discriminación.....	53
Tabla 1: Clasificación de los receptores de serotonina en el sistema nervioso central.....	71
Tabla 2. Clasificación de grupos celulares serotoninérgicos y su estructura anatómica.....	72

RESUMEN

La memoria episódica es el proceso de retención y reconstrucción de conocimiento a lo largo del tiempo para hechos, acontecimientos, personas, lugares, objetos. Se define como la memoria de “eventos en contexto”, haciendo referencia a que la información sobre eventos específicos está ligada a los contextos espaciales, temporales y situacionales en los que ocurrió. En el procesamiento cerebral de la información de memoria episódica están involucrados el hipocampo y la corteza adyacente. La serotonina es uno de los neurotransmisores que regulan la actividad de estas regiones. La recaptura, reciclaje y disponibilidad de este neurotransmisor es dependiente del transportador de serotonina (SERT), y en este sentido, existe evidencia que la expresión y función de SERT puede afectar mecanismos y procesos involucrados en la memoria. Por otra parte, el ejercicio físico ha sido también ampliamente reportado como inductor del mejoramiento de la memoria, y a la vez como un modulador de la actividad del sistema serotoninérgico. En este contexto, el objetivo de esta tesis fue evaluar si la expresión de SERT puede operar como un moderador de los efectos del ejercicio voluntario sobre la memoria episódica.

Para ello, se utilizaron ratones machos Wild Type (WT), Heterocigotos (HZ) y deficientes (Knockout, KO) de SERT, los que fueron sometidos a un protocolo de ejercicio voluntario diario, durante 8 semanas, para luego evaluar memoria episódica a través de los paradigmas Location Object Recognition (LOR) y Novel Object Recognition (NOR), y comparados con grupos control no sometidos a ejercicio.

Se encontró que la ejecución de ejercicio voluntario revierte la hipolocomoción y conducta tipo ansiosa descrita en la literatura en los roedores SERT KO y la conducta tipo ansiosa de los SERT KO y en los SERT HZ. Además, se encontró que el ejercicio voluntario mejoró la memoria episódica a largo plazo en ratones SERT HET, revirtiendo la diferencia significativa comparado a roedores WT observada en situación control.

El desarrollo de esta tesis pretende contribuir a una mejor comprensión de la interacción genético-ambiental del ejercicio con SERT, en relación con la memoria y aportar conocimientos relevantes para trastornos vinculados con esta área en humanos.

SUMMARY

Episodic memory is a process of retention and reconstruction of knowledge over time for events, events, people, places, objects, and is defined as the memory of events in context, making reference to the fact that information about specific events is linked to the spatial, temporal and situational contexts in which it occurred. The information processing of episodic memory is regulated by the hippocampus and the adjacent cortex. Among the neurotransmitters that regulate the activity of these regions is serotonin (5-HT). The reuptake, recycling and availability of this neurotransmitter is dependent on the activity of the serotonin transporter (SERT), and there is evidence indicating that its expression impacts the mechanisms underlying memory processes. Physical exercise has also been widely reported as an inducer of memory improvement and as a modulator of the serotonergic system. In this context, the aim of this thesis was to evaluate if SERT expression of SERT moderates the effects of voluntary exercise on episodic memory.

We challenged SERT knockout (KO), heterozygous (HET) and wild type (WT) mice to daily, voluntary physical activity over 8 weeks, and then evaluated episodic memory through the Location Object Recognition (LOR) and Novel Object Recognition (NOR) paradigms, and compared to non-exercise control groups.

We found that the execution of voluntary exercise reverses the hipolocomotive and anxious like behavior described in the literature in the SERT KO rodents and the anxious behavior of the SERT KO and in the SERT HZ. In addition, we found that the exercise reverted the difference with WT rodents observed in control conditions, improving long-term episodic memory in this genotype group.

The results of this thesis aim to contribute to a better understanding of the genetic-environmental interaction of voluntary exercise with SERT genotype in relation to memory processes, and provide relevant knowledge for disorders linked to this area in humans.

I. INTRODUCCION

1. Memoria episódica

La memoria es definida como el proceso de retención y reconstrucción de conocimiento a lo largo del tiempo como un resultado dinámico de varios procesos interactivos, dependiente de regiones del cerebro como el hipocampo y del lóbulo temporal medial. Se distinguen principalmente dos tipos de memoria: la memoria implícita, para las habilidades perceptivas y motrices; y la memoria explícita, para hechos, acontecimientos, personas, lugares y objetos. Los aspectos principales de la memoria implícita dependen del cerebelo, estriado y amígdala, mientras que la memoria explícita requiere del hipocampo y la corteza adyacente (Kandel et al., 2014). La memoria episódica es parte de la memoria explícita y es definida como la memoria de eventos en contexto, haciendo referencia a que la información sobre eventos específicos está ligada a los contextos espaciales, temporales y situacionales en los que ocurrió (Clayton et al., 2003). Sobre la base de esta definición operacional y las demostraciones de que los animales pueden recordar eventos en contexto (Babb y Crystal, 2006), se ha descrito que la memoria episódica debe tener tres criterios conductuales (Clayton et al., 2003):

- 1) Contenido: El individuo recuerda información sobre el evento ("qué") y el contexto ("dónde" y/o "cuándo" ocurrió).
- 2) Estructura: La información sobre el evento y su contexto está integrada en una sola representación.
- 3) Flexibilidad: La memoria se puede expresar para apoyar el comportamiento adaptativo en situaciones novedosas.

Estos criterios han proporcionado un marco teórico para las pruebas conductuales de la memoria episódica. Los tres enfoques principales utilizados para estudiar la memoria de eventos en contexto son: (a) "qué-dónde-cuándo", (b) "qué-dónde" y (c) "qué-cuándo".

- a) Memoria de "qué-dónde-cuándo": Este enfoque considera la memoria del evento, el dónde y el cuándo ocurrió. En roedores, existe evidencia de integración (Ergorul y Eichenbaum, 2004) y flexibilidad (Kart-Teke et al., 2006; Dere et al., 2005). La principal limitación de este enfoque es lo estricto del criterio de contenido, pues requiere memoria del evento y de dos dimensiones de su contexto (espacial y temporal), por lo tanto, otras formas de memoria para eventos en contexto también se consideran episódicas, las que involucran el "qué y cuándo" y el "qué y donde" (Allen y Fortin, 2013).
- b) Memoria para "qué-dónde": Este enfoque se centra en la memoria para el contexto espacial de la memoria episódica, la capacidad de recordar dónde ocurrieron eventos específicos. Es importante señalar que esta capacidad no se corresponde simplemente con la memoria de la memoria espacial, el "dónde", ya que requiere que los animales recuerden asociaciones de elementos específicos en lugares específicos. En estos paradigmas, el componente "qué" se refiere a la presentación de un elemento específico (por ejemplo, olor u objeto). El componente "dónde" varía dependiendo de la especie.
- c) Memoria para "qué-cuándo": Este enfoque requiere el recuerdo del contexto temporal en el que ocurrieron eventos específicos (Tulving, 2002). Existen diferentes formas de abordar la memoria para el "cuándo" ocurrieron los eventos, incluyendo la memoria para el orden de los eventos en una secuencia, en cuánto tiempo los eventos ocurrieron y la hora del día en que ocurrieron (Crystal, 2010; Eacott y Easton, 2010).

1.2 Estructuras cerebrales involucradas en la memoria episódica

1.2.1 Hipocampo

El hipocampo es una estructura cerebral crítica en diversos procesos incluida la memoria. Su citoarquitectura se caracteriza por capas densas de sus cuerpos celulares que componen sus regiones, tales como el subículo, giro dentado y el *cornu ammonis* (CA) (van Strien et al., 2009) (Figura 1). Las neuronas piramidales del hipocampo actúan como “place cells” o “células de lugar”; es decir, sólo se activan al pasar por una región del medio ambiente, codificando un mapa de la ubicación espacial (Knierim, 2006), por lo que el mismo entorno puede reclutar una población diferente de células en individuos diferentes y el mismo individuo puede representar diferentes entornos con diferentes subpoblaciones de células (Dombeck et al., 2010). Por otro lado, en la corteza entorrinal, las “grid cells” o “células de rejilla”, codifican el espacio y transmiten información al hipocampo acerca de la posición, dirección y distancia (Hafting et al., 2005). Además, mientras algunas neuronas aumentan su actividad en relación a los objetos, otras células desarrollan actividad específica en lugares donde objetos previamente han sido ubicados (Tsao et al., 2013), por lo que las células que responden a objetos y las células de búsqueda del objeto son independientes, definiéndose a la corteza entorrinal lateral como un componente del circuito hipocampo-cortical para la memoria de objetos y lugares (Kandel et al., 2014).

1.2.2 Región Parahippocampal

La conectividad cortico-hipocámpica de estructuras corticales asociativas sirven de interfaz entre el hipocampo y el resto del neocórtex. Estas regiones asociativas incluyen la corteza entorrinal, la corteza perirrinal y la corteza parahippocampal (corteza postrinal en roedores) (Furtak et al., 2007), que se denominan colectivamente región parahippocampal

(Figura 1). Existen dos vías principales de procesamiento de información dentro de la región parahipocampal (Figura 2). La vía del evento o del "qué", compuesta por la corteza entorrinal peririnal y lateral, la cual es importante para procesar y representar características de objetos específicos. En roedores y primates, este sistema recibe información de todas las modalidades sensoriales (Lavenex y Amaral, 2000), es crítico para la memoria de objetos (Brown y Aggleton, 2001) y contiene neuronas que responden a objetos específicos (Deshmukh et al., 2012). La segunda vía, procesa la información del "dónde" y está compuesta por la corteza parahipocampal / postrinal y la corteza entorrinal medial. Este sistema recibe principalmente información visuoespacial y participa en el procesamiento del "dónde" de la información, en donde las neuronas de la subregión de la corteza entorrinal medial, las grid cells se activan mientras los roedores exploran un determinado entorno (Fyhn et al., 2004).

1.2.3 Corteza prefrontal

La corteza prefrontal recibe información de la mayoría de las áreas de asociación cortical y proyecta a las regiones corticales y subcorticales motoras, siendo clave en la representación y ejecución de las acciones (Fuster, 2001) (Figura 2). También está conectada al hipocampo por una vía directa desde CA1 y conexiones indirectas a través de la región parahipocampal (Furtak et al., 2007; Lavenex y Amaral, 2000). Es importante destacar que muy pocas neuronas prefrontales exhiben actividad relacionada con lugares específicos en tareas conductuales, excepto en la medida en que diferentes ubicaciones espaciales estén relacionadas con distintas fases de la tarea en roedores, actividad que puede contribuir a la memoria de trabajo, razonamiento inferencial y capacidad de tomar decisiones. Esto sugiere que la corteza prefrontal es la región ejecutiva primaria del cerebro, una estructura particularmente importante en la percepción, la memoria y la acción (Fuster, 2001). En

consecuencia, el hipocampo, la región parahipocampal y la corteza prefrontal forman un sistema neural que subyace a las capacidades de memoria episódica.

1.3 Integración de la información

Antes de llegar al hipocampo, la información acerca del "qué", "dónde" o "cuándo" de los eventos individuales aún no está integrada en una sola representación, proceso que depende críticamente del hipocampo para la formación de asociaciones específicas de lugares con objetos y/o eventos (Rajji et al., 2006; Buzsáki y Moser, 2013).

La integración de la información del “qué y dónde” también se observa en las propiedades de activación de las neuronas del hipocampo, pues subconjuntos de neuronas se activan selectivamente para el "qué" (por ej., un olor específico) y el "dónde" (por ej, una localización específica), mientras que otras muestran actividad para asociaciones específicas entre ambas (un olor específico en un lugar particular) (Wood et al., 1999). Aunque los estudios sugieren que la integración de la información del “qué y donde” depende de la subregión CA3 y no de CA1 (Gilbert et al., 2003), la actividad de las neuronas del “qué y donde” ha sido reportada en ambas subregiones sin diferencias significativas (Wood et al., 1999).

El hipocampo también desempeña un papel crítico en la formación de asociaciones del “qué y cuándo”, incluyendo la memoria para el orden en que ocurrieron eventos específicos, tal como en los paradigmas de memoria de secuencias (Fortin et al., 2002). En este sentido, las neuronas individuales del hipocampo exhiben señales de sincronización durante intervalos sin estímulo, denominadas "células de tiempo" (Macdonald et al., 2011; Shapiro et al., 2011; Pastalkova et al., 2008) y durante la presentación de secuencias de eventos, capacidad que depende principalmente de la subregión CA1 del hipocampo.

Finalmente, el recuerdo episódico ocurre cuando la representación integrada del evento en el contexto es reactivada, implicando un proceso que puede ser iniciado en el hipocampo por elementos del evento o contexto, lo que conduce a la reactivación de las representaciones correspondientes en la región parahipocampal y otras áreas de asociación cortical (Eichenbaum et al., 2007). Proceso mediante el cual la información recuperada puede guiar el comportamiento dependiente de la corteza prefrontal, que evalúa la información recuperada y planea el curso de acción apropiado, que luego se transmite a las regiones motoras (Fuster, 2001).

2. Sistema serotoninérgico

2.1. Biosíntesis de serotonina

El paso inicial para la síntesis de serotonina (5-HT) en el SNC es el transporte del aminoácido triptófano desde la sangre hacia el cerebro a través de una proteína transportadora. La principal fuente de este aminoácido son las proteínas incorporadas a través de la dieta. La 5-HT es formada a partir de la hidroxilación de triptófano a 5-hidroxitriptofano (5-HTP) por medio de la enzima triptófano hidroxilasa, siendo éste el paso limitante en la biosíntesis (Frazer y Hensler, 1994).

5-HTP es rápidamente descarboxilado a 5-HT y transportado dentro de vesículas sinápticas hacia las dendritas y terminales. Por otro lado, luego de su liberación, la acción de la 5-HT es terminada a través de su recapturación por proteínas transportadoras de 5-HT en la membrana presináptica. Una vez dentro de las neuronas serotoninérgicas, el neurotransmisor puede ser realmacenado en vesículas, o bien, metabolizado primero a 5-hidroxi-indolacetaldehído, para ser degradado rápidamente al ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) a través de la monoamina oxidasa mitocondrial (MAO) (Frazer y Hensler, 1994).

2.2 Receptores de serotonina

Se han identificados 14 subtipos de receptores de 5-HT, clasificados en siete familias, 5-HT1-7, sobre la base de sus características estructurales, funcionales y farmacológicas (Tabla 1). A excepción del receptor 5-HT3 que es un canal de iones ligando-dependiente, todos los receptores de 5-HT están conformados por siete dominios transmembrana, acoplados a una proteína G. Otra característica importante de los receptores de 5-HT es su distribución precisa y generalmente limitada a determinadas áreas cerebrales (Tabla 2). Algunos subtipos de receptores de 5-HT están localizados postsinápticamente, donde activan cascadas de señalización que pueden modular el flujo de iones para despolarización o hiperpolarización neuronal, mientras otros subtipos de receptores se encuentran en el soma, dendritas o terminal de las mismas neuronas serotoninérgicas, donde tienen un rol de autorregulación neuronal. Finalmente, hay receptores que se pueden localizar también en terminales de otras neuronas, cumpliendo una función de heterorreceptores, regulando la liberación de otros neurotransmisores (Barnes y Sharp, 1999).

2.3 Proyección y neurotransmisión serotoninérgica Rafe-Hipocampo

La inervación serotoninérgica del hipocampo proviene de los núcleos del rafe medio (NRM) y dorsal (NRD) (Figura 3). Las proyecciones que surgen del NRD se ramifican ampliamente e inervan principalmente el hipocampo ventral, mientras que el NRM inerva básicamente el hipocampo dorsal (Azmitia y Segal, 1978).

Mientras que la estimulación electrofisiológica de NRD y NRM, en animales anestesiados, provoca la liberación de 5-HT en el hipocampo (McQuade y Sharp, 1995), en animales despiertos produce una disminución de los niveles extracelulares de 5-HT en el hipocampo dorsal (Mokler et al., 1998). Ambas aferencias serotoninérgicas provenientes del

NRD y NRM inervan densamente el hipocampo las cuales terminan sobre células del giro dentado, tanto células piramidales como interneuronas GABAérgicas que expresan receptores de serotonina (Andrade, 1998, Pompeiano et al., 1994).

El sistema serotoninérgico rafe-hipocampal está además controlado por mecanismos de autorregulación. Por un lado, la actividad de las neuronas serotoninérgicas se encuentra bajo el control de los autorreceptores somatodendríticos 5HT1A y 5-HT1D (Pineyro et al., 1995), en donde, la estimulación de los receptores 5-HT1A reduce los niveles extracelulares de 5-HT en el hipocampo dorsal (Peñalva, 2001). Además, la estimulación de autorreceptores ubicados en las terminales presinápticas, 5-HT1B (en roedores) o 5-HT1D (en otras especies) activa un mecanismo de autoinhibición que reduce la secreción de 5-HT, mientras que el receptor 5-HT3 desempeña una acción facilitadora en la liberación de 5-HT en el hipocampo (Mongeau et al., 1997).

2.4 Transportador de 5-HT, SERT

Evolutivamente, el transportador de 5-HT (SERT) se encuentra altamente conservado y está compuesto de catorce exones que codifican una proteína de 630 aminoácidos (Ramamoorthy et al., 1993). La actividad de SERT es capaz de regular todo el sistema serotoninérgico y sus receptores, a través del control de la concentración de 5-HT en el espacio extracelular. SERT se localiza en los terminales de las neuronas serotoninérgicas; es el encargado de la recaptura de 5-HT, e importantemente, es el blanco farmacológico de los Inhibidores Selectivos de Recaptura de Serotonina, que son utilizados principalmente como antidepresivos y ansiolíticos (Baudry et al., 2010). SERT ha sido implicado en funciones neuroendocrinas tales como el sueño y la temperatura corporal, entre otras, así como en múltiples enfermedades como el trastorno obsesivo-compulsivo, depresión, trastorno bipolar,

anomalías motrices, etc. (Murphy et al., 2008). SERT pertenece al grupo de transportadores neuronales de membrana de sustrato dependiente de Na⁺/Cl⁻, perteneciente a la familia de genes SLC6. Al recapturar 5-HT, y así regular la magnitud y alcance de las respuestas al neurotransmisor, SERT participa en el ajuste fino de las sinapsis 5HTérgicas cerebrales, así como en sus acciones periféricas. Interesantemente, la mayor expresión de SERT a nivel central se encuentra en regiones corticales y límbicas implicadas en regulación de estados emocionales y memoria (Murphy y Moya, 2011).

3. Sistema serotoninérgico y memoria episódica

Distintos elementos del sistema serotoninérgico responden a la formación de memoria episódica; en humanos, la asimetría en hipocampo de la expresión del receptor 5-HT_{1A} para la memoria de localización de objetos, está relacionada con un mejor desempeño (Glikmann-Johnston et al., 2014). Este mejor desempeño también se observa por medio de la activación crónica del receptor 5-HT₄ (Quiedeville et al., 2015) mejorando el rendimiento en el test Novel Object Recognition (NOR) (Eriksson et al., 2013). Por otro lado, se ha reportado que el bloqueo del receptor 5-HT₆, localizado en neuronas piramidales e interneuronas GABAérgicas del hipocampo (Helboe et al. (2015), mejora los déficits de memoria inducida por el antagonista muscarínico escopolamina en el reconocimiento de objetos y localización de objetos (de Bruin et al., 2011).

La importancia de SERT en la memoria se ha corroborado en distintos resultados, por ejemplo, en ratas SERT KO con depleción aguda de triptófano muestran un deterioro en la memoria a corto plazo en el test NOR (Olivier et al., 2008). Además, se ha observado que en ratas SERT KO existe una memoria episódica disminuida en el test NOR (Kauleff et al., 2007; Olivier et al., 2009). A pesar de lo reportado, existen dudas por resolver, pues hasta la

fecha no se han replicado investigaciones sobre la memoria episódica mediante el test NOR en ratones SERT KO, sólo en ratas.

4. Ejercicio y memoria episódica

La relación entre ejercicio y memoria episódica aún no es del todo clara. Los estudios en humanos son escasos y con resultados divergentes. Una revisión de Loprinzi y colaboradores (2017) mostró los resultados de ocho estudios, de los cuales, uno fue de entrenamiento de resistencia agudo y siete de entrenamiento crónico. Mientras el estudio de entrenamiento de resistencia aguda no proporcionó pruebas sólidas de un efecto potenciador en la memoria episódica, entre las siete intervenciones crónicas, que variaron de 8 a 52 semanas de duración, los resultados fueron mixtos. Cuatro de ellos (Yerokhin et al., 2012; Alves et al., 2013; van de Rest et al., 2014; Iuliano et al., 2017) no demostraron efectos benéficos del entrenamiento con sobrecarga en la memoria episódica, y tres estudios (Perrig-Chiello et al., 1998; Fiatarone Singh et al., 2014; Best et al., 2015) proporcionaron evidencia de que el entrenamiento con sobrecarga era beneficioso para mejorar la función de la memoria episódica.

Por otro lado, Dougherty et al. (2016) evaluó la asociación entre Capacidad Cardiorespiratoria (CRF, del inglés Cardiorespiratory Fitness) y el volumen del hipocampo y la memoria episódica, en una cohorte de adultos mayores cognitivamente sanos con riesgo familiar y/o genético para Enfermedad de Alzheimer (AD, del inglés Alzheimer Disease), en donde se realizaron pruebas de ejercicio máximo graduado, exploración de imágenes por resonancia magnética y una prueba de aprendizaje verbal RAVLT (RAVLT, del inglés Rey Auditory Verbal Learning Test) una herramienta neuropsicológica común utilizada para evaluar la memoria episódica (Sager et al., 2005). No se encontraron relaciones significativas entre CRF y HV o RAVLT; sin embargo, cuando la muestra fue explorada sobre la base de

género, el CRF se asoció significativamente con el volumen hipocampal para las mujeres, y en hombres, se observaron asociaciones positivas significativas entre CRF y las puntuaciones de memoria.

Al respecto, la incertidumbre (debido a la falta de descripción) de la condición física de los participantes en algunos estudios, la heterogeneidad de los métodos de entrenamiento (por ejemplo, máquinas isotónicas vs. pesos libres), la proporción de hombres y mujeres y la divergencia de resultados como la ausencia de asociación, asociaciones significativas entre ejercitación y mejoras en la memoria episódica e incluso relaciones específicas de género, demandan considerar estas posibles variables moderadoras y justifican un trabajo futuro que esclarezcan estos resultados.

En roedores, los hallazgos son más claros aunque también escasos. Castilla-Ortega et al. (2014) investigó si el ejercicio voluntario es capaz de prevenir los efectos nocivos del estrés crónico sobre la memoria episódica y la neurogénesis del hipocampo adulto. Después de la administración de bromodesoxiuridina (BrdU), los ratones fueron asignados para recibir condiciones control, estrés crónico por restricción intermitente, ejercicio voluntario o una combinación de ambos (estrés que comienza al séptimo día de ejercicio). Veinticuatro días más tarde, los ratones fueron evaluados en una tarea de memoria de reconocimiento de objetos 'qué-cuándo-dónde'. El estrés de restricción intermitente crónico afectó la neurogénesis y la memoria de "cuándo", mientras que el ejercicio promovió la neurogénesis y mejoró la memoria de "dónde". En los animales en los que se combinaron el estrés y el ejercicio, el estrés redujo notablemente la cantidad de ejercicio voluntario realizado. Sin embargo, el ejercicio aún mejoró la memoria y contrarrestó los déficits inducidos por el estrés en la neurogénesis y el comportamiento. Curiosamente, en comparación con los otros tres tratamientos, los animales sometidos a estrés mostraron un mayor aumento en la

supervivencia celular, la maduración de nuevas neuronas y la apoptosis en el Giro Dentado. La interacción entre el ejercicio y el estrés en la mejora del número de neuronas del hipocampo nacidas en adultos respalda el papel de la neurogénesis inducida por el ejercicio en condiciones estresantes.

En este sentido, se ha demostrado que el sistema serotoninérgico central es un regulador esencial de la neurogénesis hipocampal inducida por estímulos tales como el ejercicio (Klempin et al., 2013; Kondo et al, 2014). Además, el ejercicio aumenta los niveles de 5-HT en el hipocampo, lo que podría influir en las funciones cognitivas (Gomez-Merino et al., 2001).

Si bien, tanto la 5-HT como el ejercicio tienen efectos neurogénicos, antidepressivos (Moon et al., 2012) y tienen influencias sustanciales en el comportamiento y aprendizaje (Barnes y Sharp 1999, van Praag, 2009), los mecanismos de interacción son aún poco claros, y específicamente aquellos relacionados a la memoria episódica, aún no han sido completamente explorados.

Al respecto, recientemente, se investigó la posible relación del receptor 5-HT₃ con la neurogénesis del hipocampo y los cambios de comportamiento inducidos por el ejercicio, observándose que el receptor 5-HT₃ no es necesario para la proliferación celular y la neurogénesis basal, pero si lo es para la proliferación celular y la neurogénesis inducida por el ejercicio en el giro dentado del hipocampo (Kondo y Shimada, 2015). Además de corroborarse a través de la activación farmacológica del receptor 5-HT₃ con el agonista selectivo SR 57227A (Bachy et al., 1993) se indicó que la proliferación celular y la neurogénesis mediada por el ejercicio y el receptor 5-HT₃ induce efectos antidepressivos, pero no tiene efectos en el aprendizaje (Kondo y Shimada, 2015).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El rol del sistema serotoninérgico en los procesos de memoria episódica no ha sido completamente investigado, con excepción de algunos estudios sobre ciertos receptores específicos. En particular, el rol de SERT sobre estos procesos ha sido poco explorado.

Adicionalmente, la relación entre ejercicio y memoria episódica, aún no es del todo clara, pues estudios en humanos son escasos y difíciles de comparar, debido a la falta de descripción de la condición física de los participantes, la heterogeneidad de los métodos de entrenamiento, la proporción de hombres y mujeres, la divergencia de resultados. De la misma manera, los estudios en modelos animales son muy escasos, aunque menos divergentes.

Ante ello, y dado su conocido rol como modulador de la actividad del sistema serotoninérgico, surge la necesidad de evaluar en detalle el rol de la expresión de SERT sobre esta función cognitiva, así como determinar su posible rol moderador en la mejora del aprendizaje y memoria episódica inducida por el ejercicio físico.

III. HIPOTESIS

“El efecto del ejercicio físico voluntario sobre la memoria es moderado por la expresión del transportador de serotonina”

IV. OBJETIVOS

General

- ✓ Evaluar si SERT modera el efecto del ejercicio voluntario sobre la memoria episódica.

Específicos

- ✓ Implementar un protocolo de ejercicio físico voluntario en ratones SERT de los distintos genotipos.
- ✓ Desarrollar un sistema de registro automatizado para el análisis de parámetros asociados al ejercicio físico voluntario de ratones.
- ✓ Evaluar la memoria episódica a través de los tests de memoria de reconocimiento de objetos y localización de objetos.

V. METODOLOGÍA

1. Bienestar animal

Los experimentos y manipulación de los animales se realizaron de acuerdo al protocolo ético establecido por el “National Institutes of Health” (NIH) y aprobado por el comité de ética de la Universidad de Valparaíso. Así también, se respetaron los tres principios propuestos por Russell y Burch (1959) para la experimentación con animales, considerando las alternativas de reemplazo, reducción y refinamiento.

2. Animales de experimentación

Se utilizaron ratones machos SERT KO, heterocigotos (HET) y wild-type (WT) de la cepa c57/B16J pertenecientes al Laboratorio de Neurogenética del Instituto de Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso. La sala donde se llevaron a cabo los experimentos se encuentra aislada de ruidos ambientales externos. Al inicio del protocolo de ejercitación, los animales tenían 6 semanas postnatales (SPN), mientras que al inicio de las pruebas de memoria episódica tenían 12 SPN. Los animales control y los ejercitados (hasta antes del inicio del protocolo de ejercitación) se mantuvieron en jaulas estándar en grupos de 3 animales, bajo un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (8:00–20:00 horas, luz; 20:00 – 8:00 horas, oscuridad) con temperatura y humedad controladas ($20^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$; 55%). Los animales tuvieron libre acceso a agua y comida.

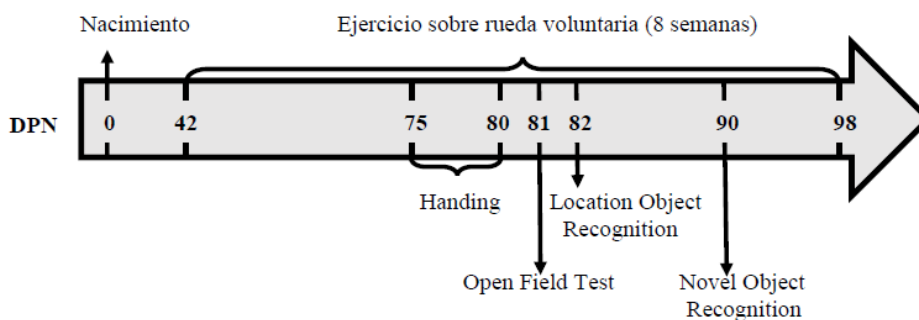
3. Diseño Experimental

Se trabajó con grupos de ratones de 6-8 y 12-14 SPN

Grupo experimental	Nº de ratones
WT sin acceso a rueda de ejercitación voluntaria + Test LOR y NOR	6
HET sin acceso a rueda de ejercitación voluntaria + Test LOR y NOR	5
KO sin acceso a rueda de ejercitación voluntaria + Test LOR y NOR	3
WT con acceso a rueda de ejercitación voluntaria + Test LOR y NOR	6
HET con acceso a rueda de ejercitación voluntaria + Test LOR y NOR	6
KO con acceso a rueda de ejercitación voluntaria + Test LOR y NOR	4

El nacimiento los roedores está representado en la línea temporal de los experimentos (Figura 4) como día post natal (DPN) 0, los cuales habitaron en sus respectivas jaulas junto a sus litter mates. Desde el DPN 42 al 98 se dividieron en 2 grupos, los genotipos SERT controles y los genotipos SERT con acceso a la rueda de ejercitación voluntaria. El DPN 82 se inició el protocolo del test LOR y el DPN 90 se inició el protocolo del test NOR. Se procedió al análisis de los datos finalizado este período.

Figura 4. Línea temporal de los experimentos



4. Protocolo de Ejercicio Físico Voluntario

A cada roedor asignado al protocolo de ejercitación voluntaria se le permitió el acceso a su respectiva jaula individual con la rueda durante 5 días a la semana en ciclos activos (20:00-8:00 horas), con un descanso de 2 días, durante 8 semanas. En los días de ejercicio, los ratones fueron transportados inmediatamente previo al inicio del ciclo activo desde sus jaulas domésticas a las asignadas con ruedas, en donde permanecieron durante todo su ciclo activo y devueltos a sus jaulas domésticas al término de éste. En el sexto y séptimo día de cada semana, descansaron junto a sus respectivas camadas. La duración de 8 semanas de ejercicio fue elegida en base a lo descrito en literatura previa sobre el efecto del ejercicio en parámetros neuroquímicos y comportamentales que involucran sistema serotoninérgico central (Greenwood y Fleshner, 2011; Greenwood et al., 2013; Kondo, 2014; Wang et al., 2014; Herrera et al., 2016; Snyder et al, 2017).

4.1 Rueda de ejercicio voluntario en ratones

La rueda de carrera voluntaria es una actividad voluntaria, en contraste con otros modelos que dependen de los estímulos aversivos para forzar el movimiento activo. Este protocolo consiste en permitir que los ratones corran libremente sobre la superficie abierta inclinada en un platillo de plástico dispuesto dentro de una jaula estándar (Goh, & Ladiges, 2015).

La mayoría de estudios publicados asume que el ejercicio voluntario varía de manera normal dentro de los distintos grupos, y no cuantifican parámetros relacionados a la actividad física. Ante ello, uno de los objetivos de esta tesis fue establecer un método para cuantificar dichos parámetros, integrando un circuito a la rueda de ejercicio. En este, las rotaciones son transmitidas electrónicamente a un concentrador USB, de modo que la frecuencia, distancia y velocidad de ejecución son capturadas por medio de un programa de software para el

almacenamiento y análisis de datos (Goh, & Ladiges, 2015) (Figura 5). Cada rueda está conectada a un sistema computarizado de monitorización de actividad, que ofrece un análisis detallado de la actividad física voluntaria para cada roedor.

4.2 Especificaciones técnicas de la rueda de ejercitación

Se usó una rueda de ejercicio de posición inclinada con rodamiento, la cual fue adaptada para integrarle un circuito. El objetivo del sistema es lograr medir la distancia y el tiempo que el ratón está sobre de la rueda, de forma voluntaria, guardando los datos en una memoria SD. Este sistema fue diseñado en conjunto con la empresa WIZ (WIZ Technologies, Chile), a través del desarrollo de esta tesis. Con esto, se procuró independizar la medición del observador, para así automatizar el experimento y poder realizar varios experimentos funcionando en paralelo.

Respecto a las especificaciones del circuito, se usaron las siguientes componentes:

- | | |
|---------------------------------------|--|
| a. Arduino nano: | Microcontrolador: Atmega 328
Voltaje de operación: 9V
Peso: 7 gr. |
| b. Modulo lector/grabador micro SD: | Voltaje de operación: 5 V |
| c. Modulo “Optical Position Encoder”: | Voltaje de operación: 5 V |
| d. Luces LEDs ultrabrillantes: | Diámetro del LEDs: 5mm
Corriente recomendada: 10-20mA
Tensión [V]: 1.8 – 3.5 [V]
Color: Azul: 465 nm a 485 nm
Verde: 520 nm a 535 nm
Amarilla: 585 nm a 595 nm
Roja: 610 nm a 620 nm |

5. Protocolo Test de localización de objetos (LOR) y reconocimiento de objetos nuevos (NOR).

Se utilizó el protocolo de (Vogel-Cierna y Wood, 2014). Los tests de reconocimiento de objetos evalúan la memoria episódica (Figura 6), aprovechan la preferencia innata de los roedores por la novedad, y no son inherentemente estresantes. La medida principal para ambas tareas es el tiempo dedicado a la exploración de los dos objetos en la prueba. Los animales que recuerdan la experiencia del entrenamiento original explorarán preferentemente el objeto desplazado en relación con el objeto inmóvil (LOR), o el objeto cambiado relativo al objeto familiar (NOR). Los tiempos de exploración se utilizan para calcular un índice de discriminación que se compara entre las condiciones experimentales consistente en el tiempo explorado el objeto trasladado/cambiado menos el tiempo explorado el objeto inmóvil/familiar, dividido por la suma de ambos, multiplicado por 100 (Vogel-Cierna y Wood, 2014). Tanto para la fase de habituación, entrenamiento y test se transportó a los roedores a la sala de experimentación 1 hora antes; no se juntaron roedores habituados, entrenados o testeados con aquellos que aún no ingresaban a la caja. Entre cada trial, la caja experimental y los objetos fueron limpiados con etanol 10% para eliminar claves olfativas.

5.1. Test de localización de objetos (LOR)

A la SPN 11 los animales fueron sometidos a 5 días de handling para aclimatarlos previo a los protocolos. Luego, a la SPN 12, los roedores control y ejercitados, comenzaron el protocolo LOR, consistente en:

- a) habituación: se ubicó al roedor en un box rectangular blanco (40 x 40 x 50 cm de alto), con 1 cm de viruta y a una intensidad de 45-48 LUX luz de medida desde el suelo de la

caja con luxómetro (Fisher Scientific). Se grabó (Sistema de análisis Ethovision) al roedor durante 5 minutos al día durante 6 días.

- b) Entrenamiento: al séptimo día, con las mismas especificaciones antes señaladas, se realiza el entrenamiento, sólo cambiando el tiempo de seguimiento y grabación a 10 minutos, trazando en la mitad de una pared del box una marca negra (señal visual). A ambos lados de la marca se ubican dos objetos iguales a una distancia de 1 cm de la pared y separados por 7 cm, entre ambos.
- c) Test: al octavo día y con las mismas especificaciones, se realiza el test, con una duración de 5 minutos y donde uno de los objetos se debe trasladar hacia el medio de la pared contraria, frente a la marca visual, y a 2.5 cm de separación de la pared.

5.2 Test de reconocimiento de objeto nuevo (NOR)

Luego de 4-7 días de descanso, se realizó el protocolo NOR, siendo las únicas diferencias con el protocolo anterior, que se utiliza un box circular (Diámetro 28,4 cm × Altura 23 cm); se traza la marca visual al centro del box (definida según la orientación del registro visual), y que uno de los objetos se ubica al costado de la marca y el otro en diagonal a este, separados 8 cm entre sí y tres 3 cm separados ambos de la pared. Por último, en el día de la prueba (octavo día), un objeto se reemplaza con un objeto novedoso.

Para analizar desde los videos el tiempo de exploración a cada objeto durante el período de entrenamiento y prueba, se debe medir con cronómetro el tiempo de interacción de un roedor con el objeto. Esto fue definido tal como en el protocolo de Vogel-Cierna y Wood (2014) cuando la nariz del ratón está a 1 cm del objeto y apunta directamente al objeto, para que una línea alargada desde los ojos hasta la nariz toque el objeto. Se debe tener particular atención a no considerar como exploración: que el roedor no se está acercando al objeto (por

ejemplo, si el roedor se reorienta a sí mismo y la nariz accidentalmente se acerca al objeto); que el roedor está en la parte superior del objeto (incluso si está mirando hacia abajo en el objeto), o que el roedor está mirando sobre el objeto o realizando un comportamiento repetitivo (como cavar cerca del objeto o morder el objeto). Los animales que no exploraron más de 3 seg en total para ambos objetos durante el entrenamiento o la prueba, y los que tienen Índices de Discriminación (ID) ± 20 en el entrenamiento tienen un sesgo significativo de ubicación/objeto y fueron excluidos del análisis.

La fórmula utilizada para determinar el ID es: $(\text{Tiempo explorando el objeto novedoso} - \text{tiempo explorando lo familiar}) / (\text{tiempo total exploración (novedoso} + \text{familiar)}) * 100$. El ID determina la preferencia de un objeto sobre otro; por ejemplo, un ID=0 indica que no hay preferencia entre los dos objetos; en cambio un ID típico para memoria de largo y corto plazo oscila entre 25 y 45. Un ID negativo grande podría indicar neofobia al objeto novedoso. Los tiempos de exploración totales típicos oscilan entre 4 y 15 segundos para una prueba de 5 min (Vogel-Cierna y Wood, 2014).

6. Actividad locomotora y conductas tipo ansiosas

6.1 Open Field Test

Con el propósito adicional de evaluar el posible efecto del ejercicio voluntario sobre la actividad locomotora general y conductas tipo ansiosas de los roedores se realizó el open field test. Este paradigma conductual se desarrolla en una caja de acrílico (40 x 40 cm x 50 cm de alto), en donde el animal se posiciona en el centro, permitiendo su exploración durante 5 minutos. La actividad de los animales se registró por videocámara y analizó posteriormente con el Software Ethovision.

Durante todos los registros, la caja fue iluminada a 40 lux y limpiada con etanol al 5% entre cada ensayo. Previo a la realización de esta prueba, se trasladó en sus respectivas jaulas a los roedores y se les habituó por 30 minutos a la sala de conducta (Seibenhener & Wooten, 2015).

Se determinó la distancia total recorrida (m), la velocidad promedio (m/s) y velocidad máxima (m/s) para cuantificar la actividad locomotora; mientras que la frecuencia (número de visitas) y el tiempo (s) de permanencia en el centro fueron utilizados para evaluar las conductas tipo ansiosas.

VI. ANALISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de 1 y 2 vías, con test de normalidad Shapiro-Wilk y con post test Tukey de comparación múltiple. Se consideró $P \leq 0.05$ como nivel de probabilidad estadísticamente significativo. Todos los datos fueron graficados como promedio \pm error estándar. Los datos obtenidos fueron analizados mediante el software OriginPro.

VII. RESULTADOS

1. Distancia total protocolo ejercitación

Se realizó un análisis ANOVA 1 vía y un post-hoc Tukey. No se observaron diferencias significativas entre genotipos SERT ejercitados en la distancia total recorrida en el protocolo de ejercitación voluntaria de 8 semanas, (Ejercitados WT= 150176,14 ± 40736,61 m; Ejercitados HZ= 167305,85 ± 92577,35 m; Ejercitados KO= 143546,54 ± 77029,61 m)

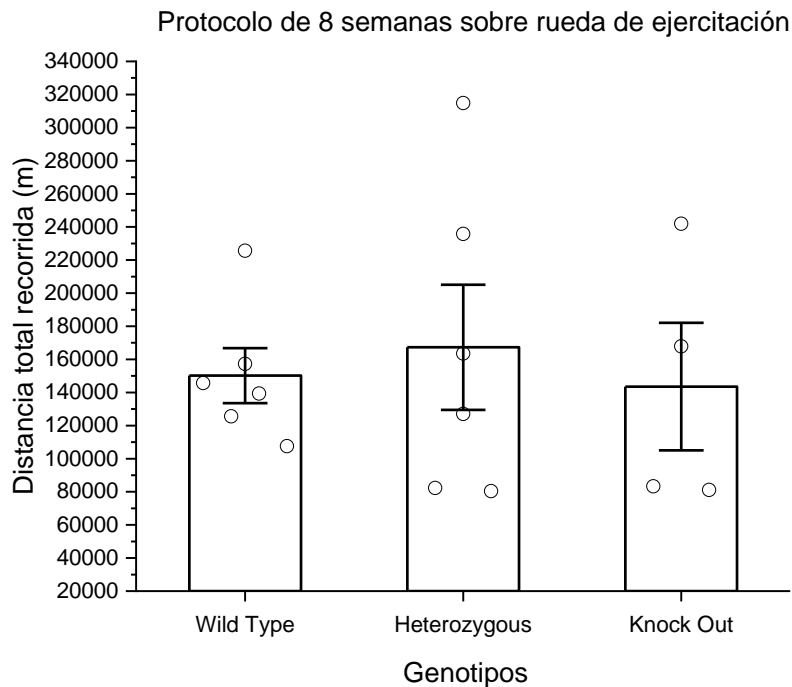


Figura 7. Protocolo de ejercitación voluntario entre genotipos SERT. Distancia recorrida total en 8 semanas (m). (SPN 14). Los datos están representados como media ± SD, *p <0.05.

2. Distancia por día protocolo de ejercitación

Se realizó un análisis ANOVA 1 vía y un post hoc Tukey. No se observaron diferencias significativas entre genotipos SERT ejercitados en la distancia recorrida por día en el protocolo de ejercitación voluntaria, (Ejercitados WT= 3754,40 ± 1018,41 m; Ejercitados HZ= 4049,62 ± 2469,22 m; Ejercitados KO= 3588,66 ± 1925,74 m).

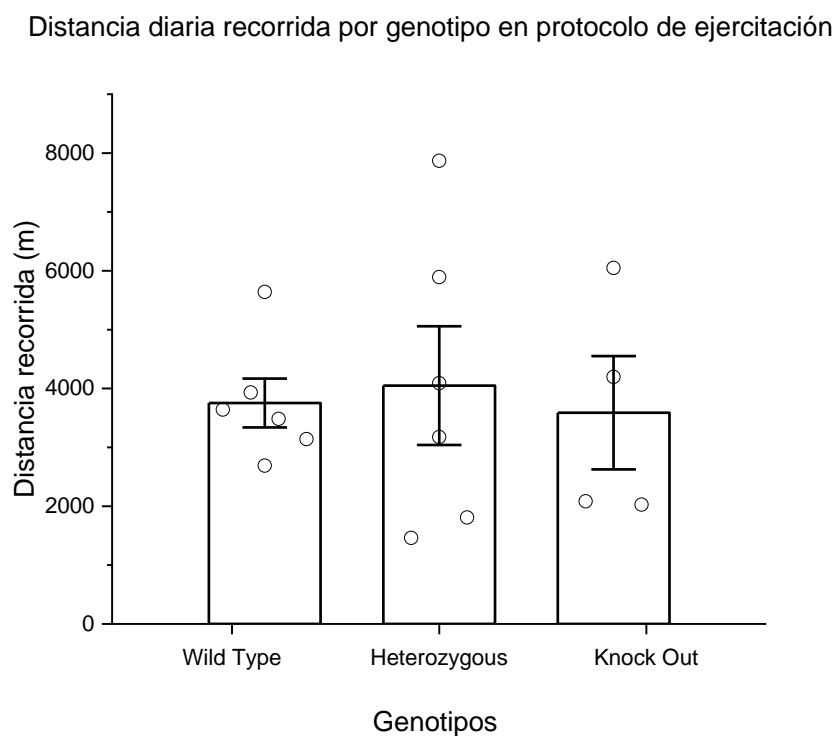


Figura 8. Protocolo de ejercitación voluntario entre genotipos SERT. Distancia recorrida por día (m). (SPN 14). Los datos están representados como media ± SD, *p <0.05.

3. Velocidad por día protocolo de ejercitación

Se realizó un análisis ANOVA 1 vía y un post hoc Tukey. No se observaron diferencias significativas entre genotipos SERT ejercitados en la velocidad por día por día en el protocolo de ejercitación voluntaria, (Ejercitados WT= $0,42 \pm 0,05$ m/s; Ejercitados HZ= $0,42 \pm 0,15$ m/s; Ejercitados KO= $0,45 \pm 0,05$ m).

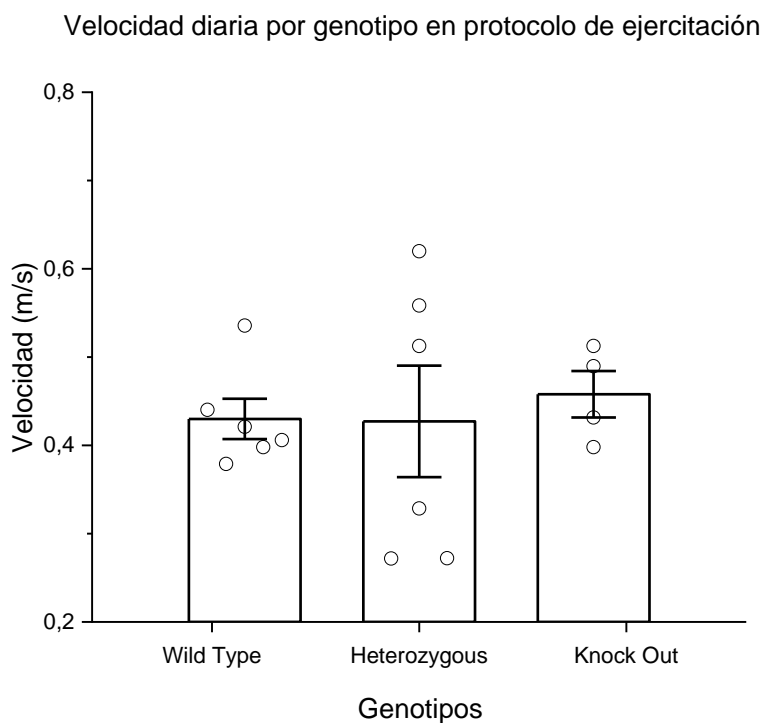


Figura 9. Protocolo de ejercitación voluntario entre genotipos SERT. Velocidad por día (m/s). (SPN 14). Los datos están representados como media \pm SD, *p <0.05.

4. Sesiones totales protocolo de ejercitación

Se realizó un análisis ANOVA 1 vía y un post hoc Tukey. No se observaron diferencias significativas entre genotipos SERT ejercitados en la cantidad de sesiones totales en el protocolo de ejercitación voluntaria de 8 semanas, (Ejercitados WT= $3452,66 \pm 566,75$; Ejercitados HZ= $2856,16 \pm 760,77$; Ejercitados KO= $3401,5 \pm 1307,08$).

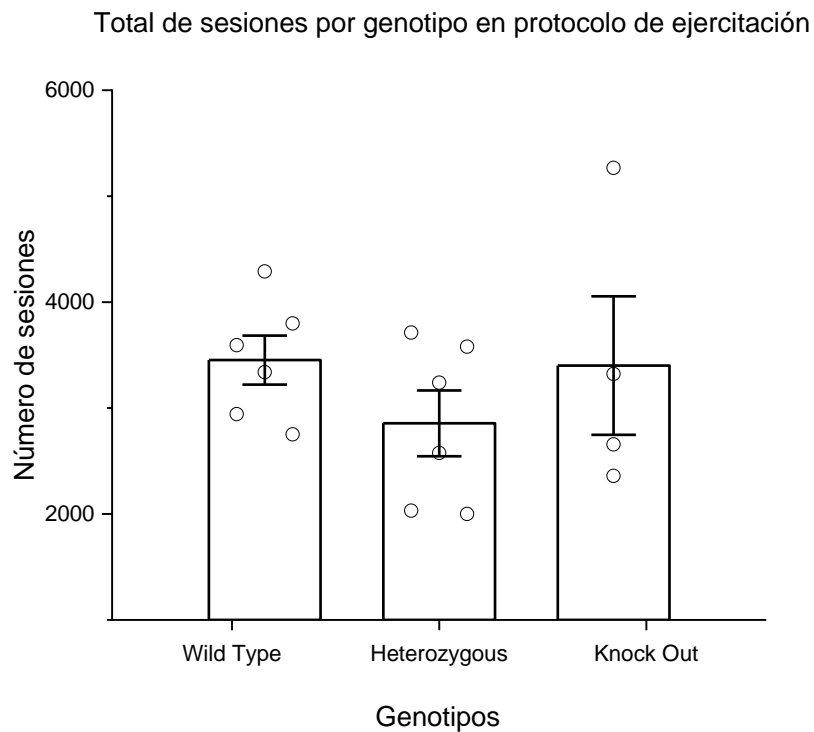


Figura 10. Protocolo de ejercitación voluntario entre genotipos SERT. Sesiones totales. (SPN 14). Los datos están representados como media \pm SD, *p <0.05.

5. Sesiones por día protocolo de ejercitación

Se realizó un análisis ANOVA 1 vía y un post hoc Tukey. No se observaron diferencias significativas entre genotipos SERT ejercitados en la cantidad de sesiones por día en el protocolo de ejercitación voluntaria, (Ejercitados WT= $86,31 \pm 14,16$; Ejercitados HZ= $71,40 \pm 19,01$; Ejercitados KO= $85,03 \pm 32,67$).

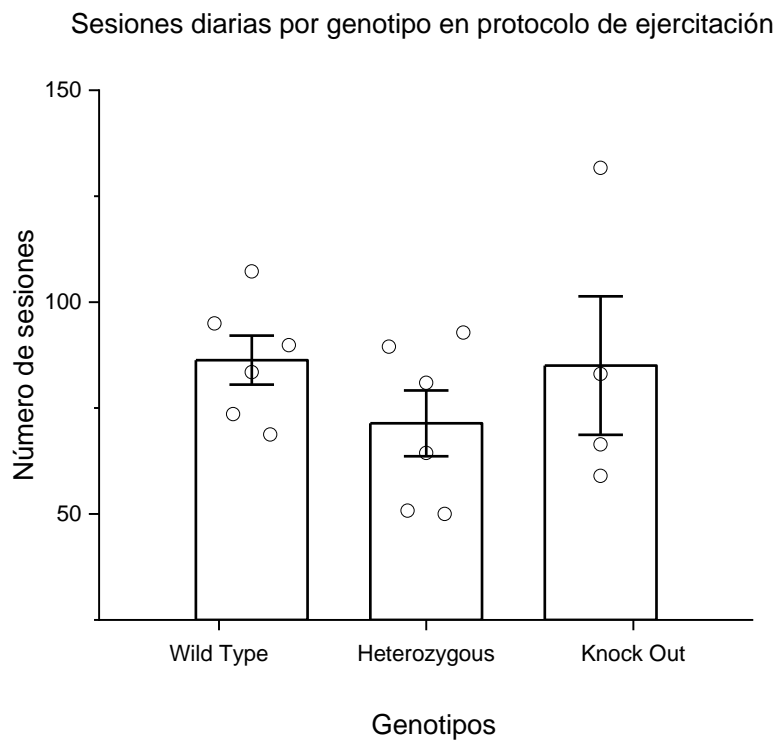


Figura 11. Protocolo de ejercitación voluntario entre genotipos SERT. Sesiones por día. (SPN 14). Los datos están representados como media \pm SD, *p <0.05.

6. Tiempo total sobre la rueda protocolo de ejercitación

Se realizó un análisis ANOVA 1 vía y un post hoc Tukey. No se observaron diferencias significativas entre genotipos SERT ejercitados en el tiempo total sobre la rueda en el protocolo de ejercitación voluntaria de 8 semanas, (Ejercitados WT= 4603,11 ± 1276,97 m; Ejercitados HZ= 4405,20 ± 1987,08 m; Ejercitados KO= 4102,80 ± 2030,21 m).

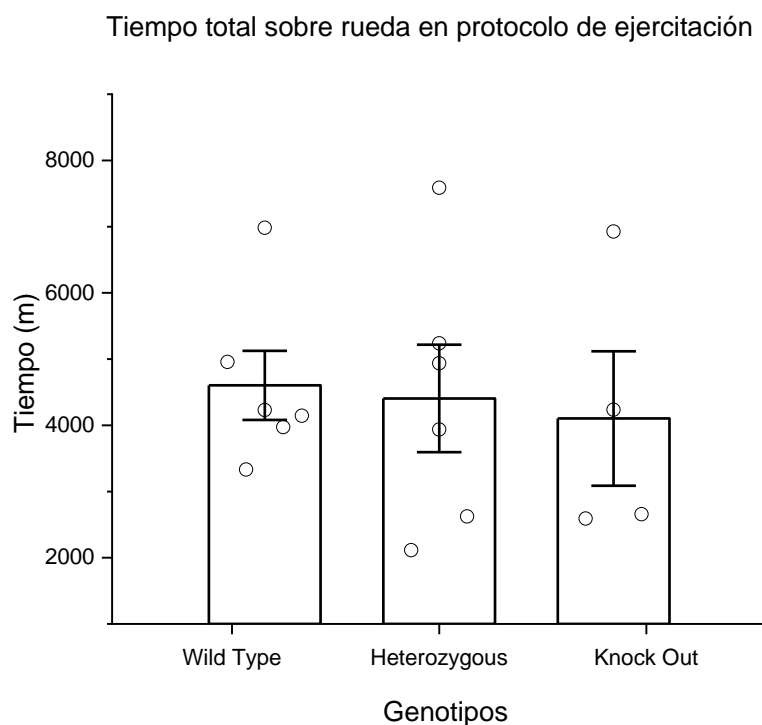


Figura 12. Protocolo de ejercitación voluntario entre genotipos SERT. Tiempo total sobre la rueda (m). (SPN 14). Los datos están representados como media ± SD, *p <0.05.

7. Tiempo por día sobre la rueda protocolo de ejercitación

Se realizó un análisis ANOVA 1 vía y un post hoc Tukey. No se observaron diferencias significativas entre genotipos SERT ejercitados en el tiempo por día sobre la rueda en el protocolo de ejercitación voluntaria, (Ejercitados WT= $115,07 \pm 31,92$ m; Ejercitados HZ= $110,12997 \pm 49,67$ m; Ejercitados KO= $102,39 \pm 50,93$ m).

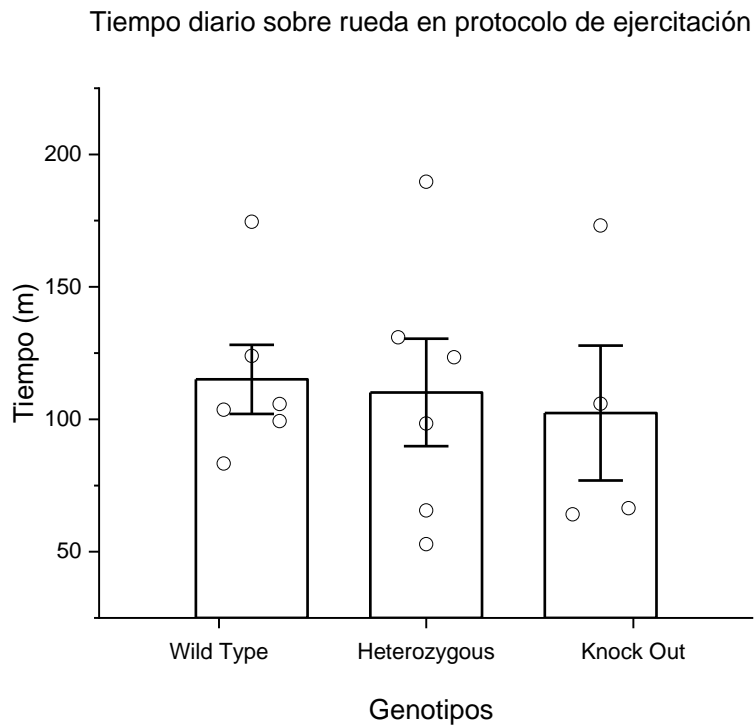


Figura 13. Protocolo de ejercitación voluntario entre genotipos SERT. Tiempo por día sobre la rueda (m). (SPN 14). Los datos están representados como media \pm SD, *p <0.05.

8. Distancia semanal recorrida por genotipo en protocolo de ejercitación.

Se realizó un análisis ANOVA 2 vías y un post hoc Tukey. Se observó una diferencia significativa entre genotipos ejercitados SERT KO y WT en la distancia recorrida en la semana 2 (Figura 14) (Ejercitados KO= 12584,56 ± 6890,83 m; Ejercitados WT= 30669,17 ± 4698,60 m; $P = 0,018$).

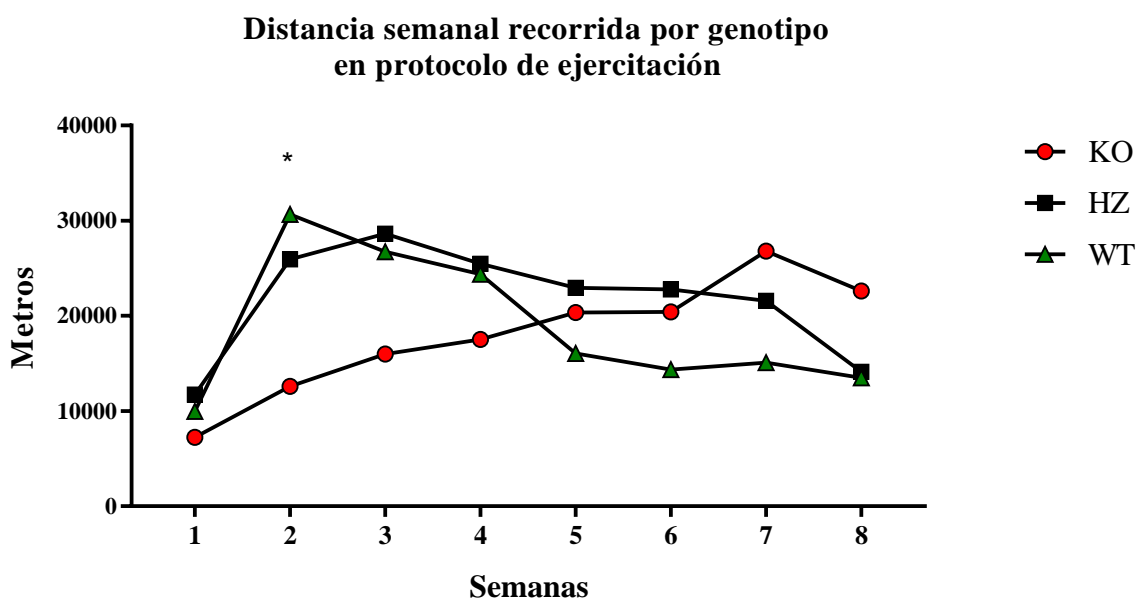


Figura 14. Protocolo de ejercitación voluntario entre genotipos SERT. Distancia semanal recorrida por genotipo (m). Los datos están representados como media ± SD, * $p < 0.05$.

Además, interesantemente, se observó una progresión en la distancia recorrida en los genotipos SERT KO, siendo la séptima semana estadísticamente significativa comparada con la segunda semana (Figura 15) (Ejercitados KO semana 2= 12584,56 ± 6890,83 m; Ejercitados KO semana 7= 26815,87 ± 12284,62 m; $P = 0,010$).

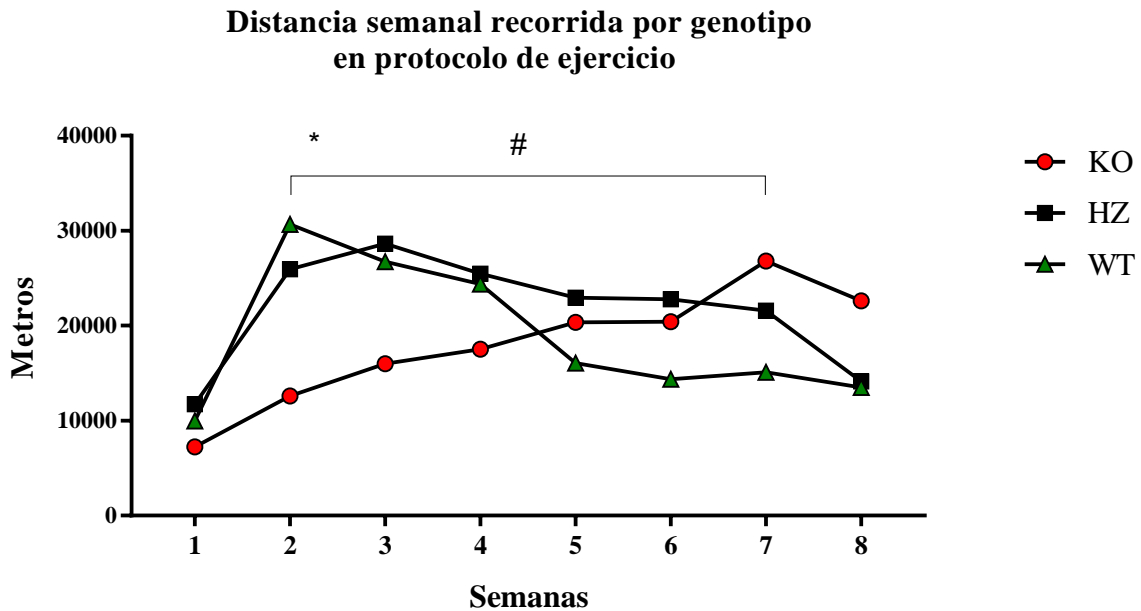


Figura 15. Protocolo de ejercitación voluntario entre genotipos SERT. Distancia semanal recorrida por genotipo (m). A diferencia del gráfico anterior se muestra la progresión de la distancia recorrida de solo el genotipo SERT KO (#). Los datos están representados como media ± SD, * $p < 0.05$.

9. Actividad locomotora Open Field Test

Se realizó un análisis ANOVA 2 vías y un post hoc Tukey. Se observaron diferencias significativas entre los grupos control y ejercitados (Controles=1470,21 ± 493,22 cm; Ejercitados= 2105,24 ± 613,28 cm; $P = 0,003$). Además, tal como está reportado en la literatura, se encontraron diferencias significativas entre controles KO y controles WT (Controles KO= 890,71 ± 528,57 cm; Controles WT= 1928,68 ± 178,78 cm; $P = 0,030$). Interesantemente, esta diferencia significativa desaparece en los roedores ejercitados KO y ejercitados WT (Ejercitados KO= 1512,25 ± 230,62 cm; Ejercitados WT= 2374,23 ± 602,92 cm; $P = 0,059$).

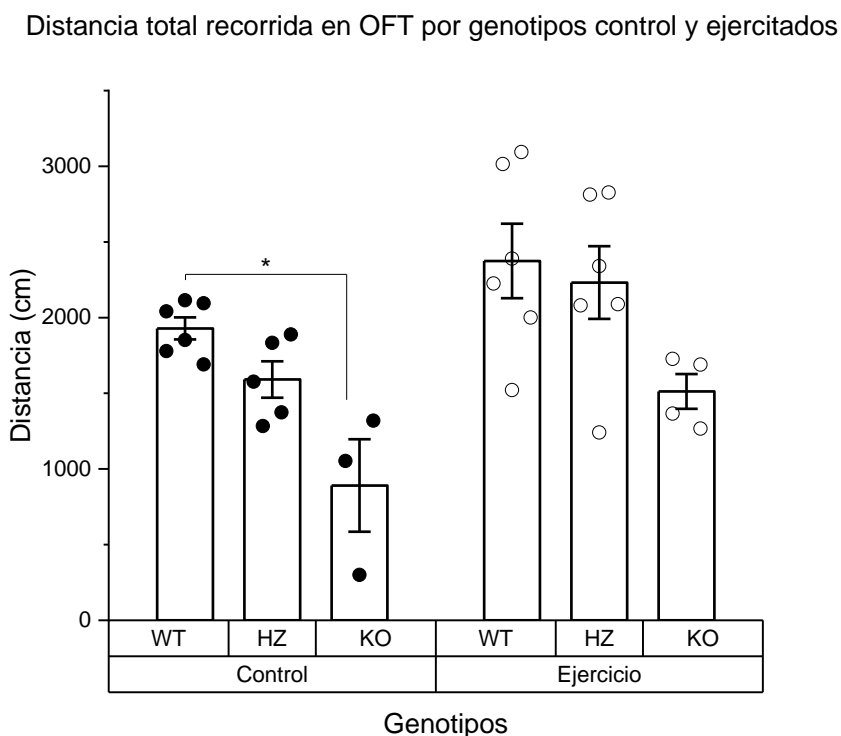


Figura 16. Efecto del ejercicio voluntario en la distancia recorrida en el Open Field Test entre genotipos SERT. Distancia recorrida (cm) (SPN 12). Los datos están representados como media ± SD, * $p < 0,05$.

10. Tiempo en el centro Open Field Test

Se realizó un análisis ANOVA 2 vías y un post-hoc Tukey. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos controles y ejercitados (Controles= $43,43 \pm 20,01$ s; Ejercitados= $54,85 \pm 20,46$ s; $P = 0,096$). Se observó una diferencia casi nominal ($P = 0,050$) entre controles WT y controles KO (Controles WT= $57,67 \pm 17,54$ s; Controles KO= $18,34 \pm 5,63$ s), en correspondencia con el fenotipo ansioso descrito para los animales SERT KO. Notablemente, esta diferencia desapareció luego del protocolo de ejercicio.

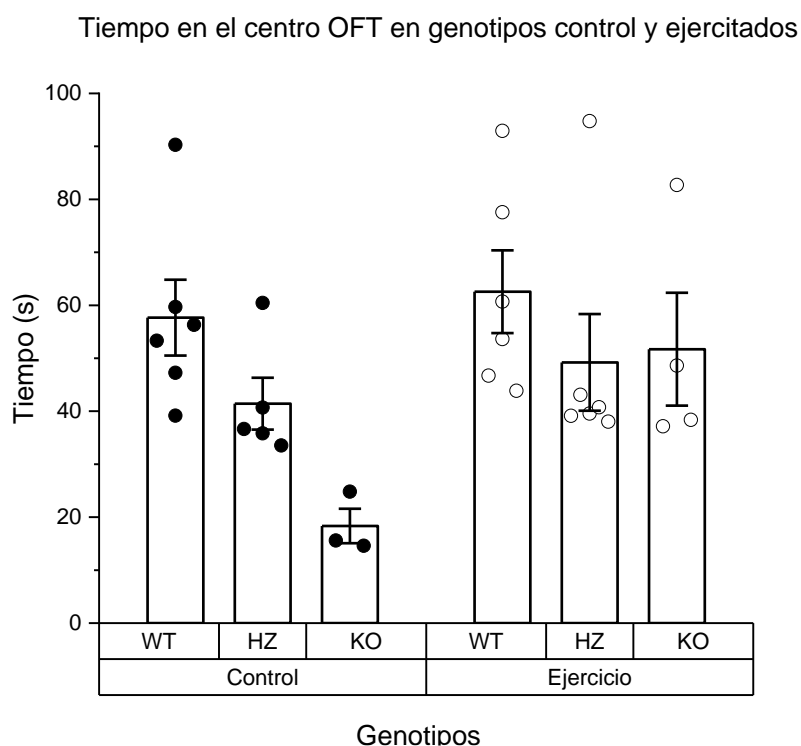


Figura 17. Efecto del ejercicio voluntario en el tiempo en el centro en el Open Field Test entre genotipos SERT. Tiempo en el centro (s) (SPN 12). Los datos están representados como media \pm SD, * $p < 0.05$.

11. Frecuencia en el centro

Se realizó un análisis ANOVA 2 vías y un post-hoc Tukey. Se encontraron diferencias significativas entre grupos control y ejercitados (Controles= $17,21 \pm 9,93$; Ejercitados= $36,25 \pm 6,00$; $P= 7,56343E-8$). Además, se encontraron diferencias significativas entre controles KO y controles WT (Controles KO= $6 \pm 2,64$; Controles WT= $25 \pm ,049$; $P= 0,002$), indicativo del fenotipo ansioso descrito en este modelo. Dicha diferencia es revertida por el ejercicio voluntario. También, se encontraron diferencias significativas entre controles KO y ejercitados KO (Controles KO= $6 \pm 2,64$; Ejercitados KO= $31 \pm 6,21$; $P= 1,89991E-4$).

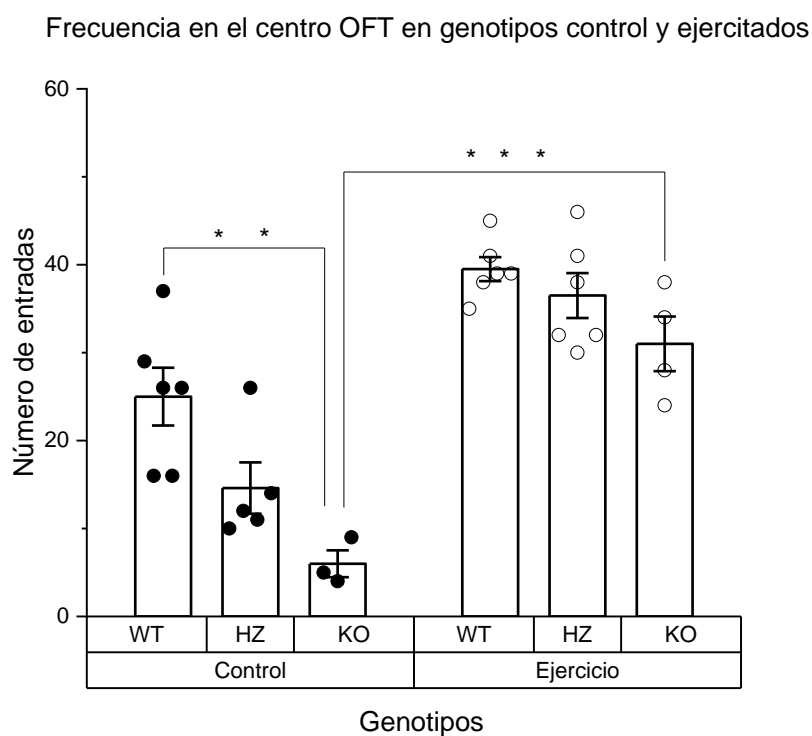


Figura 18. Efecto del ejercicio voluntario en la frecuencia en el centro del Open Field Test entre genotipos SERT. Número de entradas en el centro. (SPN 12). Los datos están representados como media \pm SD, * $p < 0,05$.

12. LOR Tiempo objeto inmóvil

Se realizó un análisis ANOVA 2 vías y un post hoc Tukey. No hay diferencias significativas entre los grupos control y ejercitados (Controles= $2,03 \pm 0,67$ s; Ejercitados= $2,17 \pm 0,88$ s; $P= 0,597$) No se encontraron diferencias significativas entre genotipos controles y ejercitados.

Tiempo en objeto inmóvil test LOR en genotipos controles y ejercitados

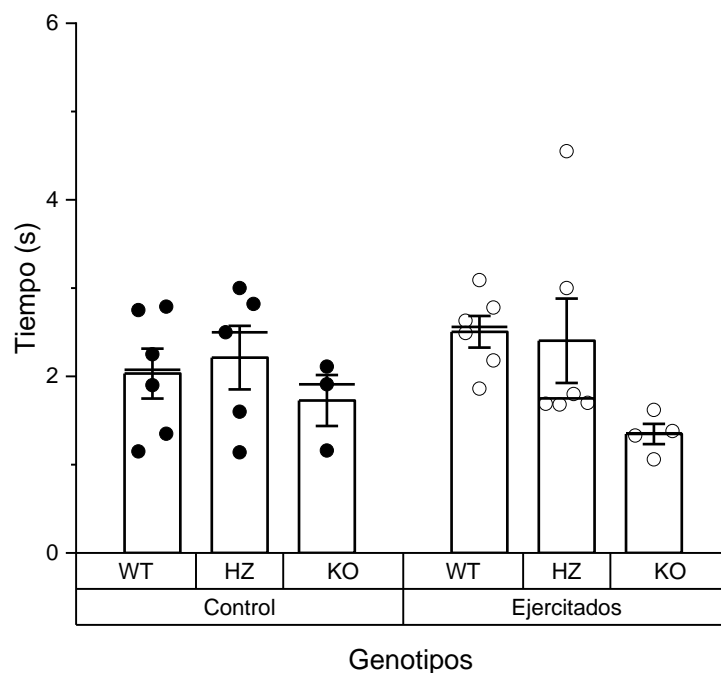


Figura 19. Location Object Recognition (LOR) entre genotipos SERT controles y ejercitados. Tiempo de exploración en el objeto inmóvil (s). (SPN 12). Los datos están representados como media \pm SD, * $p < 0.05$.

13. LOR Tiempo objeto trasladado

Se realizó un análisis ANOVA 2 vías y un y un post hoc Tukey. No hay diferencias significativas entre los grupos control y ejercitados (Controles= $3,36 \pm 1,19$ s; Ejercitados= $3,7 \pm 1,58$ s; $P= 0,368$). Además, se encontraron diferencias significativas entre controles KO y controles WT (Controles KO= $1,93 \pm 0,23$ s; Controles WT= $4,15 \pm 0,97$ s; $P= 0,043$), ejercitados KO y ejercitados WT (Ejercitados KO= $1,65 \pm 0,31$ s; Ejercitados WT= $4,30 \pm 0,60$ s; $P= 0,004$). Al igual que con el parámetro de número de toques, se observó que el ejercicio voluntario generó una mejora significativa en los animales HZ respecto al grupo KO (Ejercitados KO= $1,65 \pm 0,31$ s; Ejercitados HZ= $4,45 \pm 1,62$ s; $P= 0,002$).

Tiempo objeto trasladado test LOR en genotipos controles y ejercitados

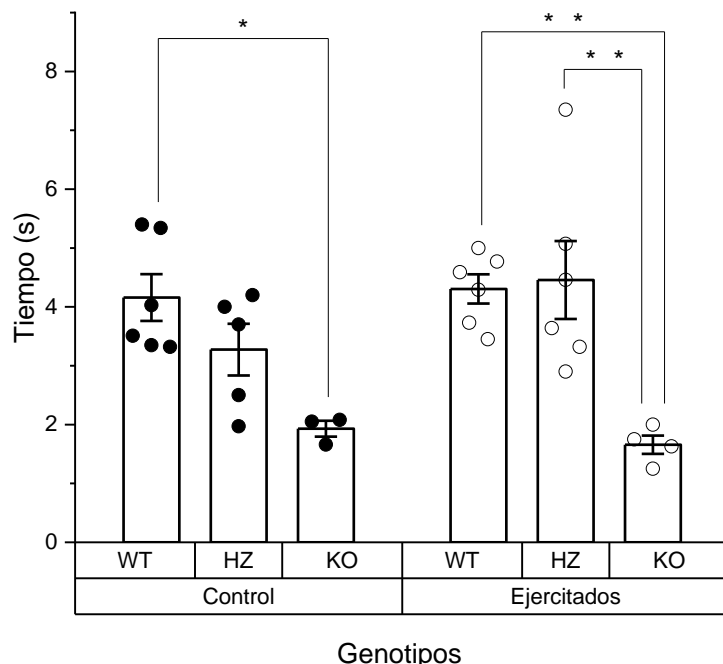


Figura 20. Location Object Recognition (LOR) entre genotipos SERT controles y ejercitados. Tiempo de exploración en el objeto trasladado (s). (SPN 12). Los datos están representados como media \pm SD, * $p < 0,05$.

14. LOR Tiempo de exploración total

Se realizó un análisis ANOVA 2 vías y un post hoc Tukey. No hay diferencias significativas entre los grupos control y ejercitados (Controles= $5,39 \pm 1,75$ s; Ejercitados= $5,74 \pm 2,49$ s; $P= 0,606$). Además, se encontraron diferencias significativas entre ejercitados KO y ejercitados WT (Ejercitados KO= $3,00 \pm 0,47$ s; Ejercitados WT= $6,81 \pm 0,96$ s; $P= 0,037$).

Tiempo exploración total test LOR en genotipos controles y ejercitados

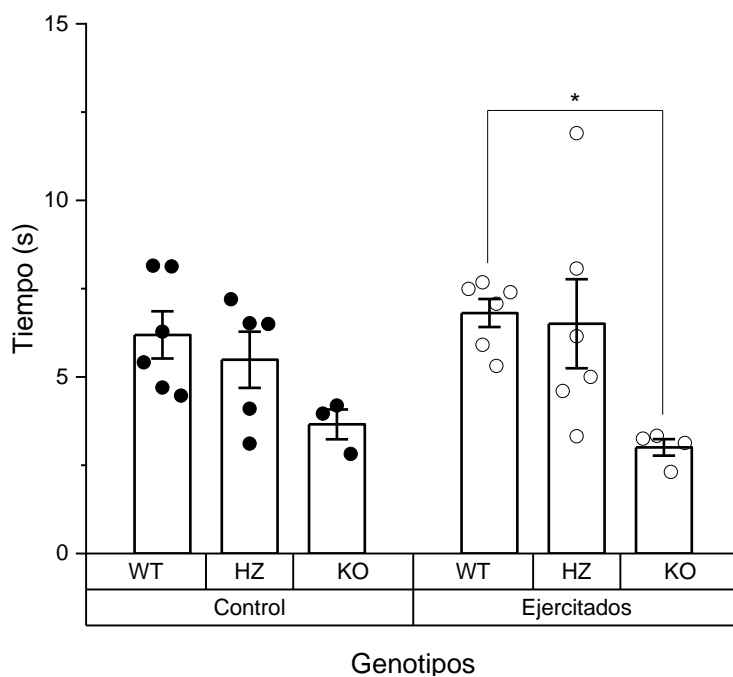


Figura 21. Location Object Recognition (LOR) entre genotipos SERT controles y ejercitados. Tiempo de exploración total (s). (SPN 12). Los datos están representados como media \pm SD, * $p < 0.05$.

15. LOR ID

Se realizó un análisis ANOVA 2 vías y un post hoc Tukey. No hay diferencias significativas entre los grupos control y ejercitados (Controles= $23,76 \pm 13,43$; Ejercitados= $24,06 \pm 10,91$; $P= 0,152$). Además, se encontraron diferencias significativas entre controles HZ y controles WT (Controles HZ= $20,37 \pm 5,26$; Controles WT= $35,06 \pm 8,56$; $P=0,037$), controles KO y controles WT (Controles KO= $6,85 \pm 9,65$; Controles WT= $35,06 \pm 8,56$; $P= 2,51692E-4$). Al analizar el efecto del ejercicio, se encontró que los animales WT no difieren de los HZ. Se encontraron diferencias significativas entre ejercitados KO y ejercitados WT (Ejercitados KO= $10,11 \pm 8,22$; Ejercitados WT= $26,57 \pm 5,32$; $P= 0,025$), ejercitados KO y ejercitados HZ (Ejercitados KO= $10,11 \pm 8,22$, Ejercitados HZ= $30,85 \pm 8,35$; $P=0,003$).

Índice de discriminación test LOR en genotipos controles y ejercitados

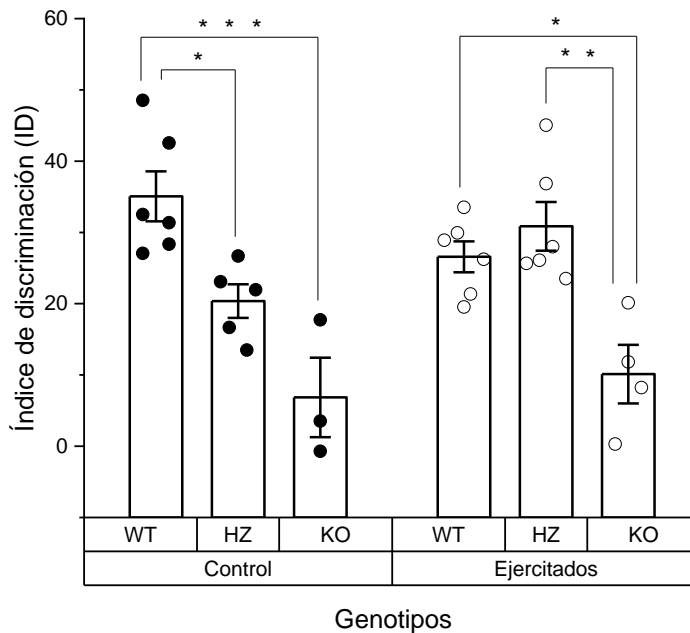


Figura 22. Location Object Recognition (LOR) entre genotipos SERT controles y ejercitados. Índice de Discriminación. (SPN 12). Los datos están representados como media \pm SD, * $p < 0.05$.

16. NOR Tiempo objeto familiar

Se realizó un análisis ANOVA 2 vías y un post hoc Tukey. No hay diferencias significativas entre los grupos control y ejercitados (Controles= $2,32 \pm 0,97$ s; Ejercitados= $2,64 \pm 0,65$ s; $P= 0,279$).

Tiempo objeto familiar test NOR en genotipos controles y ejercitados

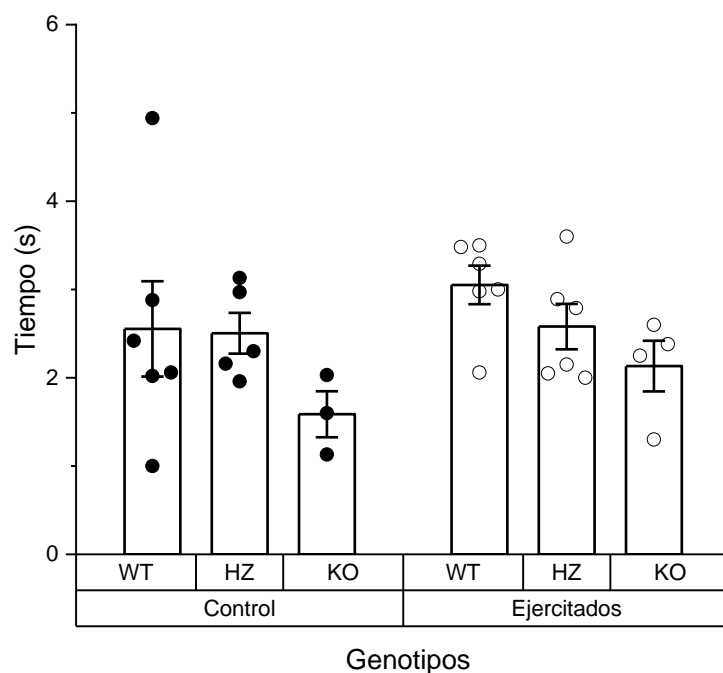


Figura 23. Novel Object Recognition (NOR) entre genotipos SERT controles y ejercitados. Tiempo de exploración en el objeto familiar (s). (SPN 12). Los datos están representados como media \pm SD, * $p < 0,05$.

17. NOR Tiempo objeto cambiado

Se realizó un análisis ANOVA 2 vías y un post hoc Tukey. No hay diferencias significativas entre los grupos control y ejercitados (Controles= $3,50 \pm 1,50$ s; Ejercitados= $3,92 \pm 1,31$ s; $P= 0,263$). Además, se encontraron diferencias significativas entre controles KO y controles WT (Controles KO= $1,63 \pm 0,32$ s; Controles WT= $4,33 \pm 1,41$ s; $P= 0,007$), ejercitados KO y ejercitados WT (Ejercitados KO= $2,21 \pm 0,50$ s; Ejercitados WT= $4,92 \pm 0,81$ s; $P= 0,003$).

Tiempo objeto cambiado test NOR en genotipos controles y ejercitados

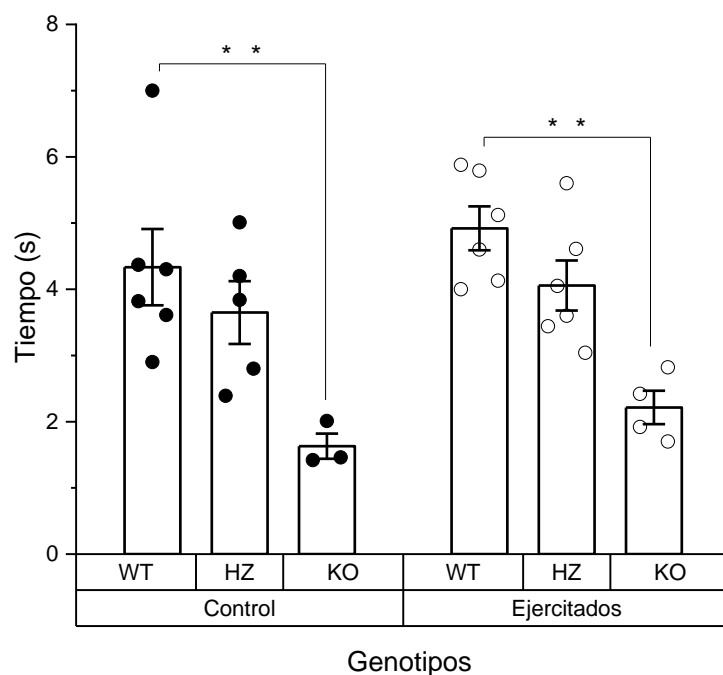


Figura 24. Novel Object Recognition (NOR) entre genotipos SERT controles y ejercitados. Tiempo de exploración en el objeto cambiado (s). (SPN 12). Los datos están representados como media \pm SD, * $p < 0.05$.

18. NOR Tiempo de exploración total

Se realizó un análisis ANOVA 2 vías y un post hoc Tukey. No hay diferencias significativas entre los grupos control y ejercitados (Controles= $5,83 \pm 2,38$ s; Ejercitados= $6,56 \pm 1,90$ s; $P= 0,252$). Además, se encontraron diferencias significativas entre ejercitados KO y ejercitados WT (Ejercitados KO= $4,34 \pm 1,00$ s; Ejercitados WT= $7,97 \pm 1,25$ s; $P= 0,030$).

Tiempo de exploración total test NOR en genotipos controles y ejercitados

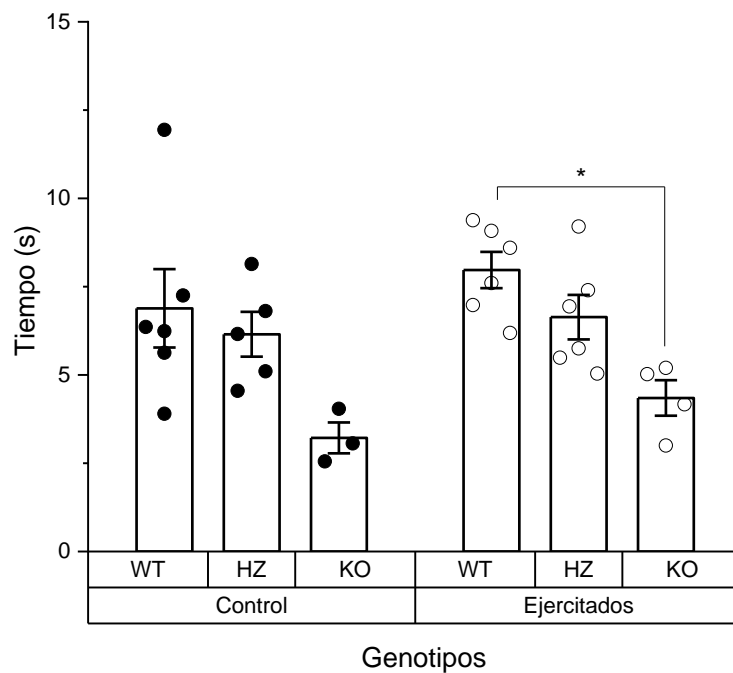


Figura 25. Novel Object Recognition (NOR) entre genotipos SERT controles y ejercitados. Tiempo de exploración total (s). (SPN 12). Los datos están representados como media \pm SD, * $p < 0.05$.

19. NOR ID

Se realizó un análisis ANOVA 2 vías y un post hoc Tukey. No hay diferencias significativas entre los grupos control y ejercitados (Controles= $18,98 \pm 14,87$; Ejercitados= $17,92 \pm 11,75$; $p = 0,759$). Además, se encontraron diferencias significativas entre controles KO y controles WT (Controles KO= $2,10 \pm 8,28$; Controles WT= $28,73 \pm 11,66$; $p= 0,005$), ejercitados KO y ejercitados WT (Ejercitados KO= $1,57 \pm 10,94$; Ejercitados WT= $23,51 \pm 6,68$; $p= 0,014$), ejercitados KO y ejercitados HZ ($p= 0,015$; Ejercitados KO= $1,57 \pm 10,94$; Ejercitados HZ= $23,24 \pm 3,52$; $p= 0,015$).

Índice de discriminación test NOR en genotipos controles y ejercitados

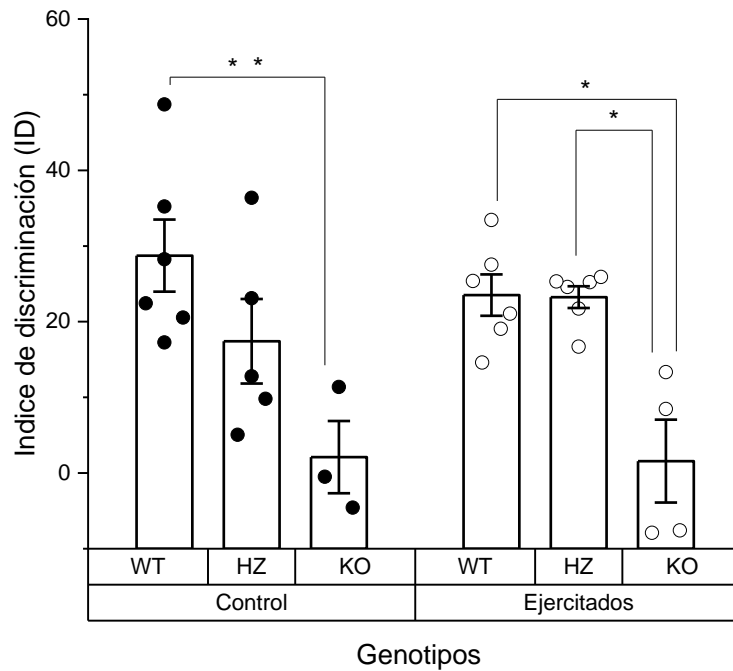


Figura 26. Novel Object Recognition (NOR) entre genotipos SERT controles y ejercitados. Índice de Discriminación. (SPN 12). Los datos están representados como media \pm SD, * $p < 0.05$.

VIII. DISCUSIÓN

1. Mediciones del ejercicio voluntario en los genotipos SERT.

No se encontraron reportes previos en literatura respecto al efecto del ejercicio voluntario en modelos genéticos con niveles alterados de SERT. En el presente trabajo, no se encontraron diferencias entre genotipos en los parámetros evaluados durante el ejercicio voluntario, tales como la distancia total recorrida; distancia recorrida por día; velocidad por día; número de sesiones por día, tiempo total sobre la rueda y en el tiempo por día sobre la rueda (Figuras 7 al 13). Al respecto, la única información previa disponible respecto a la actividad locomotora basal del ratón SERT KO indica un fenotipo hipolocomotor evaluado durante 5 minutos (Kalueff, et al, 2006; 2007) y la ausencia de hiperlocomoción inducida por MDMA (un sustrato de SERT) evaluado durante 60 minutos (Bengel et al 1998). En el presente trabajo, encontramos que el ejercicio voluntario induce un efecto benéfico sobre la hipolocomoción basal de ratones SERT KO comparado a animales WT, presentándose una tendencia similar pero que no es estadísticamente significativa al término de las 8 semanas de ejercicio. No obstante, en el seguimiento semanal de la progresión de ejercicio, se observó una significativa mayor distancia recorrida por los SERT WT versus los SERT KO en la segunda semana de protocolo. Interesantemente, esta diferencia desaparece en la siguiente semana, pues el rendimiento de los SERT KO desde la segunda a la séptima semana aumenta significativamente (Figura 14 y 15).

Este comportamiento no descrito anteriormente, puede deberse a que los paradigmas por los cuales ha sido determinada la hipolocomoción, tanto la comparación de la distancia total recorrida durante 5 minutos en un box cilíndrico entre genotipos SERT (Kauleff et al. 2007), la distancia total en un Novel Open Field Test entre dos líneas genéticas SERT KO

comparadas con sus controles (Zhao, et al. 2006), la distancia total recorrida en 60 min en un Novel Open Field Test en donde se inhibió transitoriamente 5-HTT durante el desarrollo temprano de roedores con el ISRS fluoxetina, una serotonina que produjo un efecto similar al fenotipo conductual de roedores SERT KO (Ansorge et al. 2004) y la distancia total recorrida en 60 min en un Novel Open Field Test en un tratamiento farmacológico de bloqueo del receptor 5-HT 1A en donde se comparó al SERT KO con salino con un SERT WT con salino (Alexandre, et al. 2006), han sido realizados en distintos (box y tiempo) paradigmas de Open Field en donde además interactúa el fenotipo ansioso del SERT KO. A diferencia de estos paradigmas, el protocolo de ejercitación utilizado empleó un periodo de 8 semanas, el cual puede haber disminuido el impacto de factores propios de los otros paradigmas antes mencionados, tales como un menor tiempo de habituación y la ansiedad ante el contexto novedoso. Puesto que en esta investigación el protocolo de 8 semanas de ejercicio voluntario fue eficaz en aminorar las conductas tipo ansiosas en el SERT KO y HZ, es posible considerar que erradicada esa conducta, se revierte el fenotipo conductual hipolocomotor.

2. Efecto del ejercicio voluntario en la actividad locomotora en el open field test.

Al analizar los parámetros de actividad locomotora horizontal en el open field test, se observó que, independiente de su genotipo, los animales ejercitados durante 8 semanas recorrieron significativamente más distancia que los grupos control (Figura 16). Dentro de los animales control sin ejercicio, se encontró que los ratones SERT KO recorrieron significativamente menos distancia que los controles SERT WT (Figura 16), fenotipo ya descrito previamente; del mismo modo, los animales SERT HZ presentan un fenotipo intermedio (Kauleff et al., 2007; Zhao, et al., 2006; Ansorge et al. 2004; Alexandre, et al. 2006, Murphy and Lesch, 2008). Interesantemente, se observó que en los animales

ejercitados, desapareció la diferencia significativa observadas en condiciones basales entre los genotipos SERT KO y WT. Esto demuestra que el nivel de expresión de SERT modera el efecto del ejercicio voluntario sobre la actividad locomotora de los roedores.

3. Efecto del ejercicio voluntario en las conductas tipo ansiosas de genotipos SERT.

Uno de los paradigmas clásicos para evaluar la conducta tipo ansiosa en roedores es el Open Field Test. En este, se mide el número de visitas (frecuencia) y el tiempo total que permanece el roedor en el cuadrante central. Tal como estaba previamente descrito, se encontró que, en ausencia de ejercicio, los animales SERT KO presentan una mayor conducta ansiosa (valores significativamente menores en tiempo y frecuencia en el centro) comparados al grupo SERT WT, mientras que los animales SERT HZ tienen un fenotipo intermedio, indicativo del efecto de dosis génica, también descrito en este modelo animal (Murphy and Lesch, 2008) (Figuras 17 y 18). Sin embargo, al someter a los animales al protocolo de ejercicio voluntario durante 8 semanas, dichas diferencias desaparecen, evidenciando que SERT tiene un rol moderador sobre el efecto benéfico de la actividad física. Interesantemente, el ejercicio generó una diferencia significativa entre controles SERT KO y ejercitado KO en la frecuencia en el centro en el OFT (Figura 9).

Para comprobar más robustamente el impacto moderador de SERT sobre efecto del ejercicio voluntario observado en esta tesis, sería necesario evaluar otros paradigmas de conductas tipo ansiosas, como por ejemplo el laberinto elevado en cruz o el test de emergencia luz-oscuridad, para así robustecer los resultados de la presente tesis.

4. Efectos del ejercicio voluntario en el LOR entre genotipos SERT.

Se encontraron diferencias significativas entre genotipos SERT KO y SERT HZ posterior al ejercicio en los parámetros evaluados en el test LOR, siendo los SERT HZ los más beneficiados.

No se encontraron diferencias significativas en el tiempo de exploración en el objeto inmóvil, mientras que en el tiempo de exploración en el objeto trasladado se encontraron diferencias significativas entre controles SERT WT y SERT KO y entre ejercitados SERT WT y HZ versus SERT KO. En el tiempo de exploración total (ambos objetos) se encontraron diferencias significativas entre ejercitados SERT WT y SERT KO.

Por último, se encontraron diferencias significativas en el ID entre controles SERT WT versus SERT HZ y KO, y entre ejercitados SERT WT y HZ versus SERT KO. En complemento a estos datos, si bien el principal efecto del ejercicio se observa en roedores SERT HZ, se debe considerar que la principal medida para evaluar la memoria episódica a largo plazo es la puntuación sobre 25 de ID, en la cual solo 1 de 5 roedores controles SERT HZ lo alcanza, a diferencia de los roedores ejercitados SERT HZ, donde 5 de 6 lograron superar este puntaje, observación que no necesariamente, tal como se observa en la Figura 24, se traduce en diferencias estadísticamente significativas.

En conclusión, SERT ejerce un rol moderador sobre el efecto del ejercicio voluntario en el paradigma LOR, siendo el genotipo SERT HZ el más beneficiado, presentando valores similares a los animales WT.

5. Efectos del ejercicio voluntario en el NOR entre genotipos SERT.

Se encontraron diferencias significativas entre genotipos SERT KO y SERT HZ posterior al ejercicio en los parámetros evaluados en el test NOR, siendo los SERT HZ los más beneficiados.

No se encontraron diferencias significativas en el tiempo de exploración en el objeto familiar, mientras que en el tiempo de exploración en el objeto cambiado se encontraron diferencias significativas entre controles SERT WT y SERT KO y entre ejercitados SERT WT y SERT KO. En el tiempo de exploración total (ambos objetos) se encontraron diferencias significativas entre ejercitados SERT WT y SERT KO.

Por último, se encontraron diferencias significativas en el ID entre controles SERT WT y SERT KO, y entre ejercitados SERT WT y HZ versus SERT KO. Similar al test anterior, el principal efecto del ejercicio se observa en roedores SERT HZ, donde es importante señalar que, solo 1 de 5 roedores controles SERT HZ lo alcanza un ID sobre 25, a diferencia de los roedores ejercitados SERT HZ, donde 3 de 6 lograron superar este puntaje, tal como se observa en la Figura 28. Por lo tanto, SERT tiene un efecto moderador sobre el efecto del ejercicio voluntario en parámetros de memoria evaluados en el test NOR.

IX. CONCLUSIONES

A partir de los resultados de esta investigación, podemos concluir que la ejecución de ejercicio voluntario:

- 1) Es similar en ratones, independiente de su genotipo SERT, sometidos a un protocolo de 8 semanas de ejercicio voluntario, en todas las variables analizadas.
- 2) Aumenta la actividad locomotora en ratones, independiente de su genotipo SERT, y en particular es capaz de revertir el fenotipo hipolocomotor de los ratones SERT KO en ausencia de ejercicio.
- 3) Revierte el fenotipo ansioso de ratones SERT KO, comparado a sus congéneres SERT WT, en ausencia de ejercicio.
- 4) Mejora el desempeño cognitivo de los ratones SERT HZ, tanto en el reconocimiento de objeto cambiado en el paradigma NOR, como en el de reconocimiento de objeto trasladado LOR

Por lo anteriormente demostrado, se puede concluir que existe una interacción genético-ambiental entre SERT y el ejercicio voluntario, por cuanto el primero ejerce un rol moderador sobre el efecto benéfico tanto en parámetros cognitivos como de comportamiento ansioso en el modelo de estudio.

X. BIBLIOGRAFIA

- Alexandre, C., Popa, D., Fabre, V., Bouali, S., Venault, P., Lesch, K.P., Hamon, M., Adrien, J. (2006). Early life blockade of 5-hydroxytryptamine 1A receptors normalizes sleep and depression-like behavior in adult knock-out mice lacking the serotonin transporter. *J. Neurosci.* 26, 5554–5564.
- Allen, T. A., & Fortin, N. J. (2013). The evolution of episodic memory *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110, 10379–10386. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301199110>
- Alves, CR., Merege Filho, CA., Benatti, FB., et al. (2013). Creatine supplementation associated or not with strength training upon emotional and cognitive measures in older women: a randomized double-blind study. *PLoS One.* 8: e76301. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076301>.
- Andrade R. Regulation of membrane excitability in the central nervous system by serotonin receptor subtypes. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;861:190–203.
- Ansorge, M.S., Zhou, M., Lira, A., Hen, R., Gingrich, J.A., (2004). Early-life blockade of the 5-HT transporter alters emotional behavior in adult mice. *Science* 306, 879–881.
- Azmitia, E.C. y Segal, M. (1978). An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 179, 641-667.
- Babb SJ, Crystal JD (2006) Episodic-like memory in the rat. *Curr Biol*, 16(13):1317–1321. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.05.025>
- Bachy, A., Heaulme, M., Giudice, A., Michaud, J. C., Lefevre, I. A., Souilhac, J., Le Fur, G. (1993). SR 57227A: a potent and selective agonist at central and peripheral 5-HT₃ receptors in vitro and in vivo. *European Journal of Pharmacology*, 237(2–3), 299–309. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(93\)90282-M](https://doi.org/10.1016/0014-2999(93)90282-M)
- Barnes, N. M., & Sharp, T. (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*, 38(8), 1083–1152.
- Baudry, A., Mouillet-Richard, S., Schneider, B., Launay, J.-M., & Kellermann, O. (2010). MiR-16 Targets the Serotonin Transporter: A New Facet for Adaptive Responses to Antidepressants. *Science*, 329(5998), 1537–1541. <https://doi.org/10.1126/science.1193692>
- Best, JR., Chiu, BK., Liang Hsu, C., et al. (2015). Long term effects of resistance exercise training on cognition and brain volume in older women: results from a randomized controlled trial. *J Int Neuropsychol Soc.* 21:745–756. <https://doi.org/10.1017/S1355617715000673>.

- Brown, M. W., & Aggleton, J. P. (2001). Recognition memory: What are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus?, *Nat Rev Neurosci* 2(1):51–61
- Buzsáki G, Moser EI (2013) Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nat Neurosci*, 16(2):130–138. <https://doi.org/10.1038/nn.3304>
- Castilla-Ortega, E., Rosell-valle, C., Pedraza, C., Rodríguez, F., Fonseca, D., Estivill-torrús, G., & Santín, L. J. (2014). Neurobiology of Learning and Memory Voluntary exercise followed by chronic stress strikingly increases mature adult-born hippocampal neurons and prevents stress-induced deficits in “what–when–where” memory. *Neurobiology of learning and memory*. 109, 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.12.001>
- Clayton NS, Bussey TJ, Dickinson A (2003) Can animals recall the past and plan for the future?. *Nat Rev Neurosci*, 4(8):685–691.
- Crystal, J. D. (2010). Episodic-like memory in animals. *Behavioural Brain Research*, 215(2), 235–243. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.03.005>.
- De Bruin, N. M. W. J., Prickaerts, J., Loevezijn, A. Van, Venhorst, J., Groote, L. De, Houba, P., Kruse, C. G. (2011). Neurobiology of Learning and Memory Two novel 5-HT 6 receptor antagonists ameliorate scopolamine-induced memory deficits in the object recognition and object location tasks in Wistar rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 96(2), 392–402. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2011.06.015>
- Deshmukh, S. S., Johnson, J. L., & Knierim, J. J. (2012). Perirhinal Cortex Represents Nonspatial , But Not Spatial , Information in Rats Foraging in the Presence of Objects : Comparison With Lateral Entorhinal Cortex, *Hippocampus* 22(10):2045–2058. <https://doi.org/10.1002/hipo.22046>
- Dombeck, D. A., Harvey, C. D., Tian, L., Looger, L. L., David, W., & Farm, J. (2011). Functional imaging of hippocampal place cells at cellular resolution during virtual navigation. *Nat Neurosci*. 13(11):1433-40. doi: 10.1038/nn.2648.
- Dougherty, R. J., Schultz, S. A., Boots, E. A., Ellingson, L. D., Meyer, J. D., Riper, S. Van, Cook, D. B. (2017). Relationships between cardiorespiratory fitness, hippocampal volume, and episodic memory in a population at risk for Alzheimer ’ s disease. *Brain and Behavior*. 1–12. <https://doi.org/10.1002/brb3.625>
- Eacott, M. J., & Easton, A. (2010). Neuropsychologia Episodic memory in animals : Remembering which occasion. *Neuropsychologia*, 48(8), 2273–2280. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2009.11.002>
- Eichenbaum, H., Yonelinas, A. P., & Ranganath, C. (2007). The Medial Temporal Lobe and Recognition Memory. *Annu Rev Neurosci*, 30:123-52. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.30.051606.094328>

- Ergorul, C., & Eichenbaum, H. (2004). The Hippocampus and Memory for “ What ,” “ Where ,” and “ When ,”. *Learn Mem*, (13), 397–405. <https://doi.org/10.1101/lm.73304.mals>
- Eriksson, T.M., Alvarsson, A., Stan, T.L., Zhang, X., Hascup, K.N., Hascup, E.R., Kehr, J., Gerhardt, G.A., Warner-Schmidt, J., Arango-Lievano, M., et al. (2013). Bidirectional regulation of emotional memory by 5-HT1B receptors involves hippocampal p11. *Mol. Psychia*. 18, 1096–1105.
- Fiatarone Singh, MA., Gates, N., Saigal, N., et al. (2014). The Study of Mental and Resistance Training (SMART) study-resistance training and/ or cognitive training in mild cognitive impairment: a randomized, double-blind, double-sham controlled trial. *J Am Med Dir Assoc*. 15: 873–880. <https://doi.org/10.1016/j.jamda.2014.09.010>.
- Fleshner, M., Bland, S. T., & Greenwood, B. N. (2017). Exercise increases mTOR signaling in brain regions involved in cognition and emotional behavior. *Behavioural Brain Research*, 323(February), 56–67. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.01.033>
- Fortin, N. J., Agster, K. L., & Eichenbaum, H. B. (2002). Critical role of the hippocampus in memory for sequences of events. *Nat Neurosci* 5(5):458–462. <https://doi.org/10.1038/nn834>
- Frazer, A., y Hensler, J.G. (1994). Serotonin. In basic neurochemistry, G.J. Siegel, B.W. Agranoff, R.W. Albers and P.B. Molinoff, editores (New York: Raven Press, pg. 263292.
- Furtak, S. C., Wei, S., Agster, K. L., & Burwell, R. D. (2007). Functional Neuroanatomy of the Parahippocampal Region in the Rat : The Perirhinal and Postrhinal Cortices. *Hippocampus*, 722, 709–722. <https://doi.org/10.1002/hipo>
- Fuster, J.M. (2001). The prefrontal cortex—an update: Time is of the essence. *Neuron* 30(2):319–333.
- Fyhn, M, Molden S, Witter MP, Moser EI, Moser M-B (2004). Spatial representation in the entorhinal cortex. *Science*, 305(5688):1258-1264. <https://doi.org/10.1126/science.1099901>
- Gilbert, P. E., Kesner, R. P., Allen, J., Campbell, A., Paulsen, C., Earls, S., Oldroyd, R. (2003). Localization of Function Within the Dorsal Hippocampus : The Role of the CA3 Subregion in Paired-Associate Learning. *Behav Neurosci* 117(6), 1385–1394. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.117.6.1385>
- Glikmann-Johnston, Y., Saling, M.M., Chen, J., O’Keefe, G., Gong, S., Tochon-Danguy, H., Mulligan, R. and Reutens, D.C. (2015). Hippocampal 5-HT1A receptor binding is related to object-location memory in humans. *Brain Struct. Funct.* 220, 559–570.
- Goh, J., & Ladiges, W. (2015). Voluntary Wheel Running in Mice. *Curr Protoc Mouse Biol*,

33(4), 395–401. <https://doi.org/10.1038/nbt.3121>.ChIP-nexus

Gomez-Merino, D., Bequet, F., Berthelot, M., Chennaoui, M., & Guezennec, C. Y. (2001). Site-dependent effects of an acute intensive exercise on extracellular 5-HT and 5HIAA levels in rat brain, *Neurosci Lett.* 301, 143–146.

Greenwood, B. N., & Fleshner, M. (2011). Exercise, Stress Resistance , and Central Serotonergic Systems. *Exerc Sport Sci Rev.* 39(3):140-9. doi:10.1097/JES.0b013e31821f7e45

Greenwood, B.N., Spence, K.G., Crevling, D.M., Clark, P.J., Craig, W.C., Fleshner, M. (2013) Exercise induced stress resistance is independent of exercise controllability and the medialprefrontal cortex. *Eur J Neurosci.* 37(3):469-78. doi: 10.1111/ejn.12044.

Guilloux, J. (2016). Chronic 5-HT₄ receptor agonist treatment restores learning and memory deficits in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression. *Neuroscience Letters.* <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.01.055>

Helboe, L., Egebjerg, J., and de Jong, I.E. (2015). Distribution of serotonin receptor 5-HT₆ mRNA in rat neuronal subpopulations: a double in situ hybridization study. *Neuroscience* 310, 442–454.

Herrera, J.J., Fedynska, S., Ghasem, P.R., Wieman, T., Clark, P.J., Gray, N., Loetz, E., Campeau, S., Fleshner, M., Greenwood, B.N., (2016). Neurochemical and behavioural indices of exercise reward are independent of exercise controllability. *Eur J Neurosci.* 43(9):1190-202. doi: 10.1111/ejn.13193.

Hoyer, D., Clarke, D.E., Fozard, J.R., Hartig, P.R., Martin, G.R., Mylecharane, E.J., Saxena, P.R., y Humphrey, P.P. (1994). International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacological Reviews,* 46, 157-203.

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>

Iuliano, E., Fiorilli, G., Aquino, G., et al. (2017). Twelve week exercise influences memory complaint but not memory performance in older adults: a randomized controlled study. *J Aging Phys Act.* 25: 612–620. <https://doi.org/10.1123/japa.2016-0249>.

Kart-teke, E., Silva, M. A. D. S., Huston, J. P., & Dere, E. (2006). Wistar rats show episodic-like memory for unique experiences. *Neurobiol Learn Mem,* 85, 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2005.10.002>

Katz, I.K. and Lamprecht, R. (2015). Fear conditioning leads to alteration in specific genes expression in cortical and thalamic neurons that project to the lateral amygdala. *J. Neurochem.* 132, 313–326.

- Kalueff, A. V, Gallagher, P. S., & Murphy, D. L. (2006). Are serotonin transporter knockout mice “depressed”? : hypoactivity but no anhedonia, *Neuroreport*.17(12), 15–19.
- Kalueff, A. V, Fox, M. A., & Gallagher, P. S. (2007). Hypolocomotion, anxiety and serotonin syndrome-like behavior contribute to the complex phenotype of serotonin transporter knockout mice, *Genes Brain Behav.* 389–400. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2006.00270.x>
- Klempin, F., Beis, D., Mosienko, V., Kempermann, G., Bader, M., & Alenina, N. (2013). Serotonin Is Required for Exercise-Induced Adult Hippocampal Neurogenesis. *J Neurosci.* 33(19), 8270–8275. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5855-12.2013>
- Knierim, J. J., Lee, I., & Hargreaves, E. L. (2006). Hippocampal Place Cells : Parallel Input Streams, Subregional Processing, and Implications for Episodic Memory, *Hippocampus*, 764, 755–764. <https://doi.org/10.1002/hipo>
- Kondo, M., Nakamura, Y., Ishida, Y., & Shimada, S. (2014). The 5-HT₃ receptor is essential for exercise-induced hippocampal neurogenesis and antidepressant effects. *Molecular Psychiatry*, 20(11), 1428–1437. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.153>
- Kondo, M., & Shimada, S. (2015). Exercise-induced neuronal effects and the 5-HT₃ receptor. *Mol Psychiatry*. 2–6. <https://doi.org/10.14800/nt>.
- Lavenex, P., & Amaral, D. G. (2000). Hippocampal-Neocortical Interaction: A Hierarchy of Associativity, *Hippocampus*. 10(4):420-30.
- Lebourgeois, G. (2016). Time-dependent impact of glutamatergic modulators on the promnesiant effect of 5-HT₆R blockade on mice recognition memory. *Pharmacological Research*. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.06.009>
- Lesch, K. P., Balling, U., Gross, J., Strauss, K., Wolozin, B. L., Murphy, D. L., & Riederer, P. (1994). Organization of the human serotonin transporter gene. *Journal of Neural Transmission. General Section*, 95(2), 157–162.
- Loprinzi, P. D., Frith, E., & Edwards, M. K. (2018). Resistance exercise and episodic memory function : a systematic review, 1–7. <https://doi.org/10.1111/cpf.12507>
- Macdonald, C. J., Lepage, K. Q., Eden, U. T., & Eichenbaum, H. (2011). Article Hippocampal “Time Cells” Bridge the Gap in Memory for Discontiguous Events. *Neuron*, 71(4), 737–749. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.07.012>
- McQuade, R. y Sharp, T. (1995). Release of cerebral 5-hydroxytryptamine evoked by electrical stimulation of the dorsal and median raphe nuclei: effect of a neurotoxic amphetamine. *Neuroscience* 68, 1079-1088.

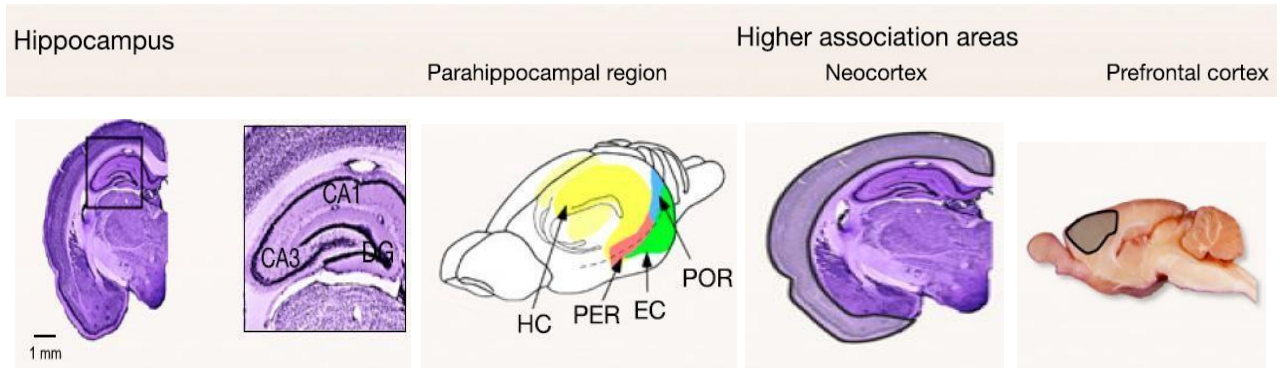
- Meneses, A. (2017). Frameworking memory and serotonergic markers. *Reviews in the Neurosciences*, 0(0). <https://doi.org/10.1515/revneuro-2016-0079>
- Mokler, D. J., Lariviere, D., Johnson, D. W., Theriault, N. L., Bronzino, J. D., Dixon, M., & Morgane, P. J. (1998). Serotonin Neuronal Release From Dorsal Hippocampus Following Electrical Stimulation of the Dorsal and Median Raphe ´ Nuclei in Conscious Rats, *Hippocampus*, 273, 262–273.
- Mongeau, R., Blier, P., & Montigny, C. De. (1997). The serotonergic and noradrenergic systems of the hippocampus : their interactions and the effects of antidepressant treatments. *Brain Res Brain Res Rev.* 23(3):145-95
- Moon, H., Kim, S., & Yang, Y. (2012). Macrophage migration inhibitory factor mediates the antidepressant actions of voluntary exercise. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205535109/>-
/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1205535109
- Murphy, D. L., & Lesch, K. (2008). Targeting the murine serotonin. *Nature reviews Neuroscience.* 9(february), 14–16. <https://doi.org/10.1038/nrn2284>
- Murphy, D. L. and Moya, P. R. (2011). Human serotonin transporter gene (SLC6A4) variants : their contributions to understanding pharmacogenomic and other functional G Å G and G Å E differences in health and disease. *Current Opinion in Pharmacology*, 11(1), 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2011.02.008>
- Olivier, J. D. A., Jans, L. A. W., Korte-Bouws, G. A. H., Korte, S. M., Deen, P. M. T., Cools, A. R., Blokland, A. (2008). Acute tryptophan depletion dose dependently impairs object memory in serotonin transporter knockout rats. *Psychopharmacology*, 200(2), 243–254. <https://doi.org/10.1007/s00213-008-1201-0>
- Olivier, J. D. A., Jans, L. A. W., Blokland, A., Broers, N. J., Homberg, J. R., Ellenbroek, B. A., & Cools, A. R. (2009). Serotonin transporter deficiency in rats contributes to impaired object memory. *Genes, Brain and Behavior*, 8(8), 829–834. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2009.00530.x>
- Pastalkova, E., Itskov, V., & Amarasingham, A. (2008). Internally generated cell assembly sequences in the rat hippocampus. *Science* 321(5894):1322–1327. <https://doi.org/10.1126/science.1159775>
- Penas-Cazorla, R. and Vilaró, M.T. (2015). Serotonin 5-HT4 receptors and forebrain cholinergic system: receptor expression in identified cell populations. *Brain Struct. Funct.* 220, 3413–3434.
- Perrig-Chiello, P., Perrig, WJ., Ehram, R., et al. (1998). The effects of resistance training on wellbeing and memory in elderly volunteers. *Age Ageing.* 27: 469–475.

- Pineyro, G., Demontigny, C., y Blier, P. (1995). 5-HT_{1D} receptors regulate 5-HT release in the rat raphe nuclei - in vivo voltammetry and in vitro superfusion studies. *Neuropsychopharmacology* 13, 249-260.
- Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G. Distribution of the serotonin 5-HT₂ receptor family mRNAs: comparison between 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Brain Res Mol Brain Res.* 1994;23(1-2):163–78
- Quiedeville, A., Boulouard, M., Hamidouche, K., Da Silva Costa-Aze, V., Nee, G., Rochais, C., Dallemagne, P., Fabis, F., Freret, T., and Bouet, V. (2015). Chronic activation of 5-HT₄ receptors or blockade of 5-HT₆ receptors improve memory performances. *Behav. Brain Res.* 293, 10–17.
- Rajji, T., Chapman, D., Eichenbaum, H., & Greene, R. (2006). The Role of CA3 Hippocampal NMDA Receptors in Paired Associate Learning. *J Neurosci* 26(3):908–915. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4194-05.2006>
- Ramamoorthy, S., Bauman, A. L., Moore, K. R., Han, H., Yang-Feng, T., Chang, A. S., Blakely, R. D. (1993). Antidepressant- and cocaine-sensitive human serotonin transporter: molecular cloning, expression, and chromosomal localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(6), 2542–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.6.2542>
- Ramirez, M. J., Lai, M. K. P., Tordera, R. M., & Francis, P. T. (2014). Serotonergic Therapies for Cognitive Symptoms in Alzheimer’s Disease: Rationale and Current Status. *Drugs*, 74, 729–736. <https://doi.org/10.1007/s40265-014-0217-5>
- Sager, M. A., Hermann, B., & Rue, A. L. (2005). Middle-aged children of persons with Alzheimer’s disease: APOE Genotypes and cognitive function in the wisconsin registry for alzheimer’s prevention. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology*, 18, 245–249.
- Seibenhener, M. L., & Wooten, M. C. (2015). Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice, (February), 1–6. <https://doi.org/10.3791/52434>
- Shapiro, M. L. (2011). Memory Time. *Neuron*, 71(4), 571–573. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.08.006>
- Snyder, J. S., Cahill, S. P., & Frankland, P. W. (2017). Running promotes spatial bias independently of adult neurogenesis, *Hippocampus*. 27(8):871-882. <https://doi.org/10.1002/hipo.22737>
- Stefanko, D. P., Barrett, R. M., Ly, A. R., Reolon, G. K., & Wood, M. A. (2009). Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 9;106(23):9447-52. doi: 10.1073/pnas.0903964106.

- Tsao, A., Moser, M., & Moser, E. I. (2013). Report Traces of Experience in the Lateral Entorhinal Cortex. *Current Biology*, 23(5), 399–405.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.01.036>
- van de Rest, O., van der Zwaluw, NL., Tieland, M., et al. (2014) Effect of resistance-type exercise training with or without protein supplementation on cognitive functioning in frail and pre-frail elderly: secondary analysis of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Mech Ageing Dev.* 136–137: 85–93.
<https://doi.org/10.1016/j.mad.2013.12.005>.
- van Praag, H. Van, Kempermann, G., & Gage, F. H. (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci*, 2(3):266-70. <https://doi.org/10.1038/6368>
- van Praag, H. (2005). Exercise Enhances Learning and Hippocampal Neurogenesis in Aged Mice. *Journal of Neuroscience*, 25(38), 8680–8685.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1731-05.2005>
- van Praag, H. (2009). Exercise and the brain: something to chew on. *Trends in Neurosciences*, 32(5), 283–290. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.12.007>
- van Strien, NM., Cappaert, NLM., Witter, MP. (2009) The anatomy of memory: An interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat Rev Neurosci*, 10(4):272–282.
- Vogel-Ciernia, A., & Wood, M. A. (2014). Examining object location and object recognition memory in mice. *Current Protocols in Neuroscience*, 2014(October), 8.31.1-8.31.17. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0831s69>
- Wang, D., Zhai, X., Chen, P., Yang, M., Zhao, J., Dong, J., & Liu, H. (2014). Hippocampal UCP2 is essential for cognition and resistance to anxiety but not required for the benefits of exercise. *Neuroscience*, 277, 36–44.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.06.060>
- Wood, E. R., Dudchenko, P. A., & Eichenbaum, H. (1999). The global record of memory in hippocampal neuronal activity. *Nature* 397(6720):613–616.
- Yerokhin, V., Anderson-Hanley, C., Hogan, MJ., et al. (2012) Neuropsychological and neurophysiological effects of strengthening exercise for early dementia: a pilot study. *Neuropsychol Dev Cogn B Aging Neuropsychol Cogn.* 19: 380–401.
<https://doi.org/10.1080/13825585.2011.628378>.
- Zhao, S., Edwards, J., Carroll, J., Wiedholz, L., Millstein, R.A., Jaing, C., Murphy, D.L., Lanthorn, T.H., Holmes, A. (2006). Insertion mutation at the C-terminus of the serotonin transporter disrupts brain serotonin function and emotion-related behaviors in mice. *Neuroscience* 140, 321–334.

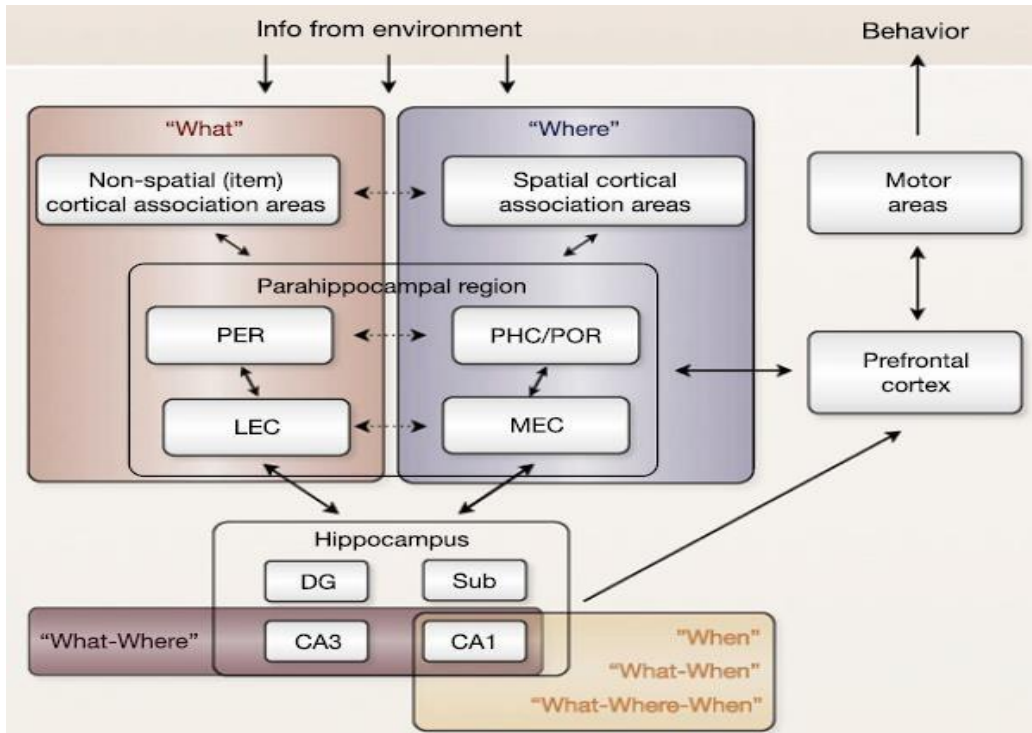
XI. FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Regiones cerebrales involucradas en la memoria episódica en roedores.



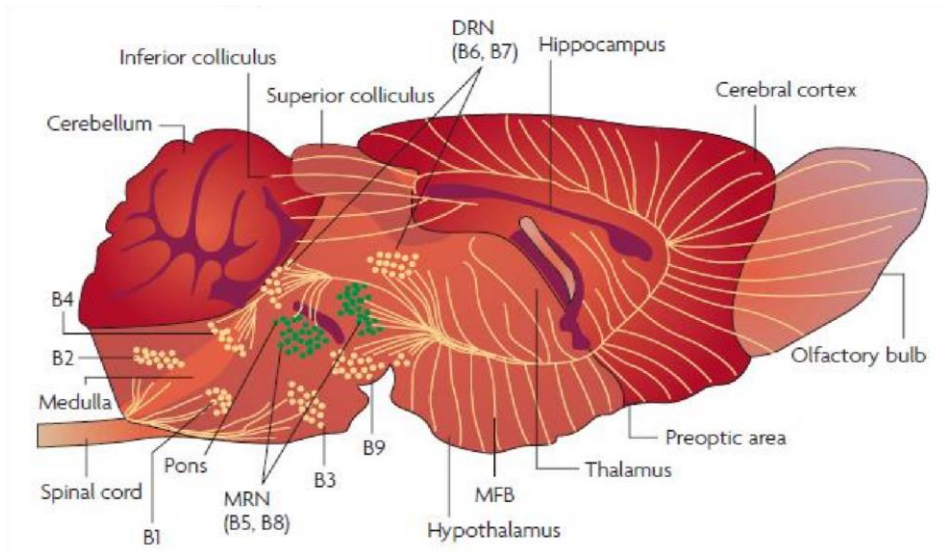
Fuente: Allen y Fortin (2013)

Figura 2. Circuito neural subyacente a la memoria episódica en roedores.



Fuente: Allen y Fortin (2013)

Figura 3. Proyecciones Serotoninérgicas del Núcleo Dorsal y Medial del Rafe



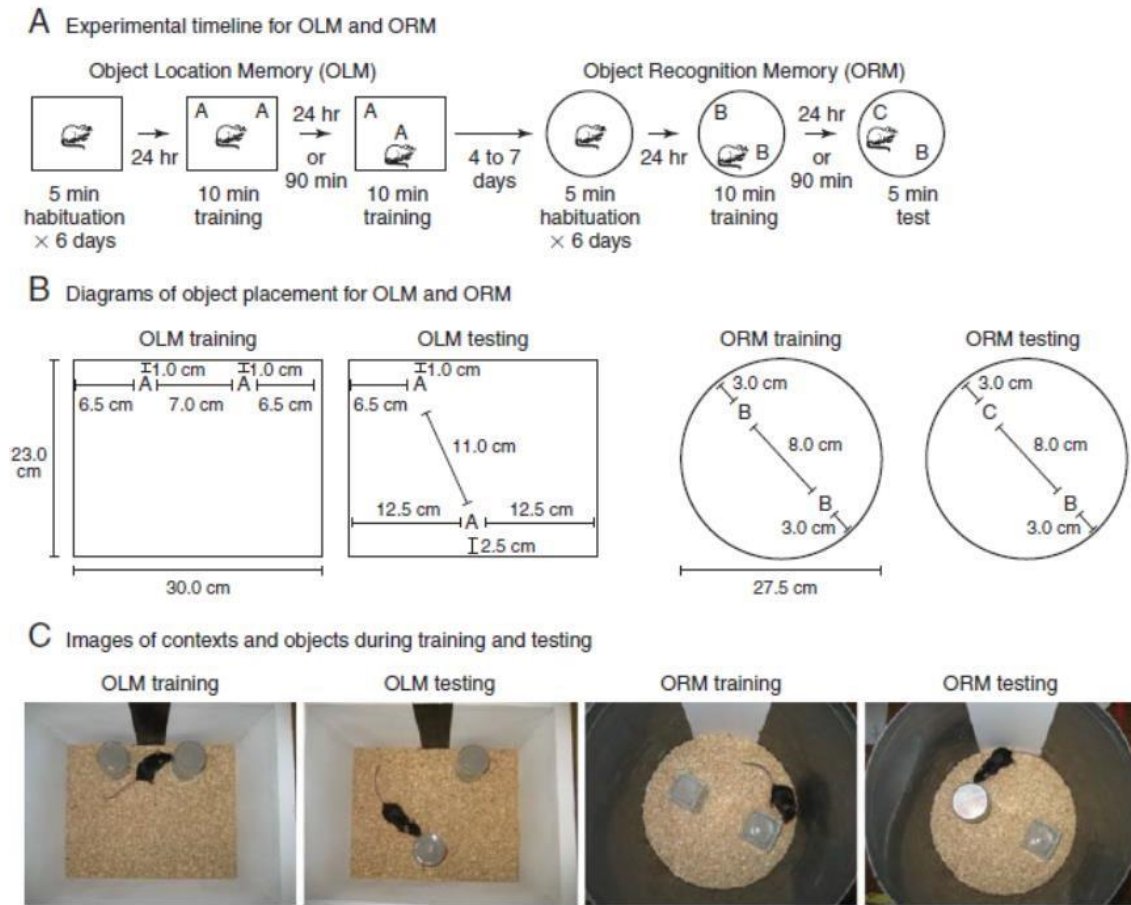
Fuente: Dennis L. Murphy and Klaus-Peter Lesch (2008)

Figura 5. Modelo de rueda de carrera voluntaria



Fuente: WIZ Technologies (2017).

Figura 6. Protocolo Novel Object and Location Recognition



Fuente: Vogel-Cierna y Wood (2014)

Tabla 1. Clasificación de los receptores de serotonina en el sistema nervioso central

Receptor	Distribución
5-HT _{1A}	Hipocampo, amígdala, septum, corteza entorrinal y cingulata, hipotálamo, núcleos del rafe
5-HT _{1B}	Ganglios basales, hipocampo (ARNm)
5-HT _{1D}	Ganglios basales, hipocampo, corteza, núcleos del rafe y núcleo accumbens (ARNm)
5-HT _{1E}	Corteza entorrinal, caudado putamen, hipocampo, amígdala
5-HT _{1F}	Corteza cingulata y entorrinal, estriado. hipocampo, bulbo olfatorio, NRD
5-HT _{2A}	Corteza, estriado, hipocampo. núcleo accumbens, bulbo olfatorio, núcleo Caudado
5-HT _{2B}	Cerebelo, septum lateral, hipotálamo dorsal, amígdala media
5-HT _{2C}	Plexo coroideo, corteza, hipotálamo, hipocampo, núcleo accumbens, amígdala, ganglios de la base, septum, central grey, médula espinal
5-HT ₃	Hipocampo, corteza entorrinal, amígdala, núcleo accumbens, tracto solitario, nervio trigémino, médula espinal, nervio vago
5-HT ₄	Hipocampo, estriado, bulbo olfatorio, sustancia negra
5-HT _{5A}	Hipocampo, hipotálamo, corteza, tálamo, estriado, bulbo, médula
5-HT _{5B}	Hipotálamo, hipocampo, habénula, NRD, bulbo olfatorio, corteza entorrinal y piriforme
5-HT ₆	Estriado, bulbo olfatorio, núcleo accumbens, hipocampo
5-HT ₇	Corteza, septum, tálamo, hipotálamo, hipocampo, amígdala, colículos superior

Fuente: Frazer y Hensler (1994), Barnes y Sharp (1999), Hoyer et al. (1994).

Tabla 2. Clasificación de los grupos celulares serotoninérgicos y su estructura anatómica

	Grupo de cuerpos celulares conteniendo 5-HT	Estructura anatómica
Grupo con proyecciones hacia la médula espinal	B 1	Núcleo del rafe pálido, médula ventrolateral caudal
	B 2	Núcleo del rafe oscuro
	B 3	Núcleo del rafe magnus; médula ventrolateral rostral, núcleos reticulares intermedios
	B 4	Núcleo del rafe oscuro (parte dorsolateral)
Grupo con proyecciones hacia el cerebro anterior	B 5	Núcleo del rafe medio (parte caudal)
	B 6	Núcleo del rafe dorsal (parte caudal)
	B 7	Núcleo del rafe dorsal (parte rostral)
	B 8	Núcleo del rafe medio (parte rostral), núcleo lineal caudal; núcleo del pontis oralis
	B 9	Núcleo del pontis oralis; región supralemniscal

Fuente: Frazer y Hensler (1994)