

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

**EVALUACIÓN DE CAMBIOS EN MEMORIA Y APRENDIZAJE EN  
RATONES DEFICIENTES DEL GEN DEL TRANSPORTADOR DE  
SEROTONINA**

**Luis Manríquez Cockbaine**

**Proyecto de Tesis para optar al grado de  
Magíster en Ciencias Biológicas Mención Neurociencia**

**Director de Tesis:**

**Dr. Pablo Moya**

**Co-director:**

**Dr. Álvaro Ardiles**

**2018**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera agradecer en primer lugar a mis profesores tutores Pablo Moya y Álvaro Ardiles quienes me apoyaron y enseñaron en todas las etapas que resultaron del trabajo realizado en esta tesis. También a las personas que de alguna u otra manera apoyaron este trabajo, resolviendo o aclarando dudas. Destaco de manera especial a Ivana Gajardo y David Neira, también a Claudia Delgado y María José Cossio. Finalmente a mi familia que pese a todos los inconvenientes y dificultades me apoyaron durante el desarrollo del trabajo.

## **FINANCIAMIENTO**

Esta tesis se realizó gracias al financiamiento de:

Beca CONICYT/Magíster en Chile para Profesionales de la Educación año 2014-2015.  
Folio 22130094

Proyectos FONDECYT N° 1141272 (PRM); FONDECYT N°11150776 (AOA), ICM-MINECOM 130011 (Nu-MIND) e ICM-MINECOM P09 022-F (CINV)

# INDICE

ABREVIATURAS .....	5
LISTA DE FIGURAS .....	6
RESUMEN .....	8
SUMMARY .....	10
1. MARCO TEÓRICO .....	12
1.1 Serotonina y sistema serotoninérgico.....	12
1.2 El transportador de serotonina SERT.....	15
1.3 El ratón SERT Knockout como modelo .....	17
1.4 Serotonina y memoria .....	19
1.5 Paradigmas comportamentales de memoria y flexibilidad cognitiva.....	21
1.6 Modelos animales de SERT en memoria y aprendizaje.....	23
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	25
2.1 Hipótesis .....	25
2.2 Objetivos.....	25
2.2.1 Objetivo general .....	25
2.2.2 Objetivos Especificos .....	25
3. METODOLOGÍA.....	26
3.1 Animales.....	26
3.2 Genotipificación.....	27
3.3 Pruebas conductuales .....	28
3.3.1 Tarea campo Abierto (Open field) .....	29
3.3.2 Reconocimiento de objetos (NOR) .....	30
3.3.3 Laberinto de Barnes (BM) .....	33
3.4 Software y análisis estadístico.....	36
4. RESULTADOS .....	37
4.1 Tarea campo Abierto (Open field) .....	38
4.2 Tarea de reconocimiento de objetos (NOR).....	40
4.3 Laberinto de Barnes (BM) .....	43
4.3.1 Latencia Primaria .....	44
4.3.2 Latencia Escape.....	53
4.3.3 Errores primarios .....	61
5. DISCUSIÓN.....	69
5.1 Tarea campo Abierto (Open field) .....	69
5.2 Tarea de reconocimiento de objetos (NOR).....	70
5.3 Laberinto de Barnes (BM) .....	73
5.3.1 Latencia Primaria .....	76
5.3.2 Latencia Escape.....	79
5.3.3 Errores primarios .....	81
6. CONCLUSIONES.....	83
7. BIBLIOGRAFÍA .....	85
8. ANEXOS.....	93

## **ABREVIATURAS**

<b>5-HT</b>	<b>Serotonina</b>
<b>SERT</b>	<b>Transportador de Serotonina</b>
<b>NOR</b>	<b>Reconocimiento de Objetos Nuevos</b>
<b>MRO</b>	<b>Memoria de Reconocimiento Objetos</b>
<b>MRL</b>	<b>Memoria de Reconocimiento Lugar</b>
<b>BM</b>	<b>Barnes Maze</b>
<b>MCP</b>	<b>Memoria Corto Plazo</b>
<b>MLP</b>	<b>Memoria Largo Plazo</b>

## LISTA DE FIGURAS Y GRÁFICOS

<b>Figura 1.</b> Biosíntesis y metabolismos de 5-hidroxitriptamina .....	13
<b>Figura 2.</b> Vías de la 5-hidroxitriptamina en el encéfalo.....	14
<b>Figura 3.</b> Sinapsis serotoninérgica y transportador de serotonina.....	16
<b>Figura 4.</b> Recombinación genética del gen 5-HTT .....	18
<b>Figura 5.</b> Esquema trabajo pruebas conductuales .....	28
<b>Figura 6.</b> Esquema etapas tarea de reconocimiento de objetos NOR .....	32
<b>Figura 7.</b> Esquema etapas test Barnes maze .....	35
<b>Figura 8.</b> Gráfico distancia recorrida (open file).....	38
<b>Figura 9.</b> Gráfico tiempo en el centro (open file) .....	39
<b>Figura 10.</b> Gráficos tarea reconocimiento objetos NOR.....	42
<b>Figura 11.-</b> Gráficos latencia primarias (etapa adquisición y reversión).....	45
<b>Figura 12.</b> Gráficos latencia primaria (días 1-5-6-10-17).....	49
<b>Figura 13.</b> Gráficos latencia primaria (triales 1 y 4).....	51
<b>Figura 14.</b> Gráficos latencia escape (etapa adquisición y reversión).....	53
<b>Figura 15.-</b> Gráficos latencia de escape (días 1-5-6-10-17).....	57
<b>Figura 16.</b> Gráficos latencia de escape (triales 1 y 4) .....	59
<b>Figura 17.</b> Gráficos errores primarios (etapa adquisición y reversión).....	61
<b>Figura 18.</b> Gráficos errores primarios (días 1-5-6-10-17).....	65

<b>Figura 19.</b> Gráficos errores primarios (triales 1 y 4).....	67
<b>Anexo Figura 1.</b> Tabla principales subtipos de receptores de 5-HT.....	94
<b>Anexo Figura 2.</b> Objetos utilizados para la prueba NOR. ....	95
<b>Anexo Figura 3.</b> Etapa de familiarización .....	96
<b>Anexo Figura 4.</b> Memoria de Reconocimiento de lugar (MRL). ....	96
<b>Anexo Figura 5.</b> Memoria de Reconocimiento de Objetos (MRO).....	97
<b>Anexo Figura 6.</b> Gráficos latencia primaria .....	98
<b>Anexo Figura 7.</b> Gráficos latencia de escape.....	99
<b>Anexo Figura 8.</b> Gráficos errores primarios .....	100

## RESUMEN

La serotonina (5-HT) es un neurotransmisor del Sistema Nervioso central (SNC) que participa en múltiples procesos neurobiológicos, incluyendo el aprendizaje y la memoria. A nivel de la sinapsis, el transportador de 5-HT (SERT) controla la acción del neurotransmisor a través de su recaptura y reciclaje. Existen algunas variantes del gen que codifica para SERT, que afectan su expresión, y que están asociadas a cambios en la regulación emocional y funciones cognitivas en humanos. Correspondientemente, estudios en modelos animales (ratas y ratones) deficientes de SERT (knockout, KO) han descrito alteraciones en conductas tipo-ansiosas y en algunos parámetros cognitivos. Al respecto, comparados con ratones con expresión normal (wild-type, WT), los ratones SERT KO presentan déficits en la memoria espacial, que serían dependientes de la reactividad al estrés. Por otro lado, algunos autores sugieren que los ratones SERT KO presentarían una mejora en la memoria de trabajo y en la flexibilidad cognitiva, aunque a edades no comparables entre los dos estudios. Sin embargo, a la fecha, se desconoce si los ratones SERT KO presentan alteraciones en la memoria episódica y de reconocimiento de objetos, o si la mejora en la flexibilidad cognitiva se presenta en procesos de memoria espacial. Tampoco existe información relativa a posibles diferencias entre procesos de memoria espacial a corto versus a largo plazo. El objetivo del presente trabajo fue investigar los efectos que tendría la alteración de la expresión de SERT en el desempeño de ratones adultos entre 8 y 12 semanas de edad en paradigmas de procesos de memoria de reconocimiento de objetos y episódica a corto y largo plazo, en aprendizaje espacial y flexibilidad cognitiva. En la tarea de reconocimiento de objetos (NOR), no fue posible

medir el aprendizaje debido a que no se cumplió el paradigma. En la prueba de laberinto de Barnes (BM), observamos que los ratones SERT KO presentarían dificultades en la memoria a corto y largo plazo en la etapa de adquisición del aprendizaje solo en el parámetro de latencia de escape, no así en la latencia primaria y en los errores primarios. En el aprendizaje de reversión no observamos mejoras en el genotipo SERT KO ya que en el parámetro de latencia de escape observamos un peor desempeño y en la latencia primaria como en los errores primarios, solo observamos una tendencia a un mejor aprendizaje. Finalmente, al comparar el rendimiento del aprendizaje de la fase de reversión con la fase de adquisición, evidenciamos mejoras en la primera ya que los tiempos y número de errores disminuyen.

Palabras clave:

Serotonina, SERT, aprendizaje, aprendizaje por reversión, memoria de trabajo, memoria episódica, memoria a corto plazo, memoria a largo plazo, flexibilidad cognitiva.

## SUMMARY

Serotonin (5-HT) is a central nervous system (CNS) neurotransmitter that participates in multiple neurobiological processes, including learning and memory. At the level of the synapse, the 5-HT transporter (SERT) controls the action of the neurotransmitter through its recapture and recycling. There are some variants of the gene that codes for SERT, which affect its expression, and which are associated with changes in emotional regulation and cognitive functions in humans. Correspondingly, studies in animal models (rats and mice) deficient of SERT (knockout, KO) have described alterations in anxious-type behaviors and in some cognitive parameters. In this regard, compared to mice with normal expression (wild-type, WT), SERT KO mice have deficits in spatial memory, which would be dependent on the reactivity to stress. On the other hand, some authors suggest that SERT KO mice would present an improvement in working memory and cognitive flexibility, although at ages not comparable between the two studies. However, to date, it is unknown if SERT KO mice present alterations in episodic memory and object recognition, or if the improvement in cognitive flexibility occurs in spatial memory processes. There is also no information regarding possible differences between short-term and long-term spatial memory processes. The aim of the present work was to investigate the effects that the alteration of SERT expression would have on the performance of adult mice between 8 and 12 weeks of age in paradigms of memory processes of object recognition and episodic in the short and long term, in spatial learning and cognitive flexibility compared to heterozygous and WT mice. In the task of object recognition (NOR), it was not possible to measure learning because the paradigm was not met. In the Barnes maze test (BM), we observed that SERT KO mice would have short and long term memory difficulties in the

learning acquisition stage only in the escape latency parameter, but not in the primary latency and in the primary errors. In terms of short-term memory, we only observed learning difficulties in the SERT KO genotype in the escape latency parameter, but not in primary latency and primary errors. In the learning of reversion, we did not observe improvements in the SERT KO genotype since in the parameter of escape latency we observed a worse performance and in the primary latency as in the primary errors, we only observed a tendency to a better learning. Finally, when comparing the learning performance of the reversion phase with the acquisition phase, we show improvements in the first since the times and number of errors decrease.

Keywords:

Serotonin, SERT, learning, reversion learning, working memory, episodic memory, short-term memory, long-term memory, cognitive flexibility.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 Serotonina y sistema serotoninérgico

La serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) es una amina biogénica que actúa como neurotransmisor y neuromodulador y que se distribuye por todo el organismo ejerciendo múltiples funciones. La 5-HT se sintetiza a partir del aminoácido triptófano, el cual es esencial en la dieta. El triptófano es hidroxilado mediante la enzima triptófano-5-hidroxilasa dando origen al 5-hidroxitriptófano (figura 1). Esta molécula, tras una descarboxilación por medio de la L-aminoácido aromático descarboxilasa da lugar finalmente a la 5-HT (Fidalgo et al., 2013).

La 5-HT se localiza en el tracto gastrointestinal, en las plaquetas, neuronas 5-HTérgicas del SNC y del sistema nervioso entérico (Gershon, 2004). En el SNC, la 5-HT se encuentra fundamentalmente en grupos de neuronas en la región del rafe, protuberancia y en el tronco encefálico superior (figura 2), las cuales tienen amplias proyecciones hacia el encéfalo anterior, núcleo accumbens y estriado (Berger et al., 2009). La 5-HT está involucrada en diferentes funciones, incluyendo el sueño, apetito, temperatura, ansiedad, actividad motora, ritmo biológico, aprendizaje y memoria (Roth et al., 2004). A la fecha, se han identificado y caracterizado 14 subtipos de receptores de 5-HT (Anexo Tabla 1), que han sido agrupados en siete subgrupos (5-HT<sub>1</sub> a 5-HT<sub>7</sub>), (Berger et al., 2009). Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, con la excepción del receptor 5-HT<sub>3</sub> que es un canal iónico activado por ligando (Hoyer y Martín, 1997).

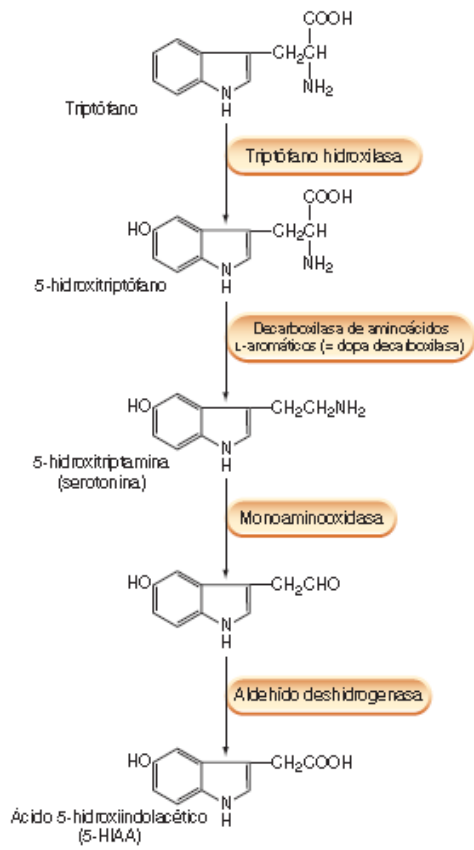


Figura 1. Biosíntesis y metabolismo de la 5-hidroxitriptamina. Figura extraída de Rang y Dale, Farmacología (2008).

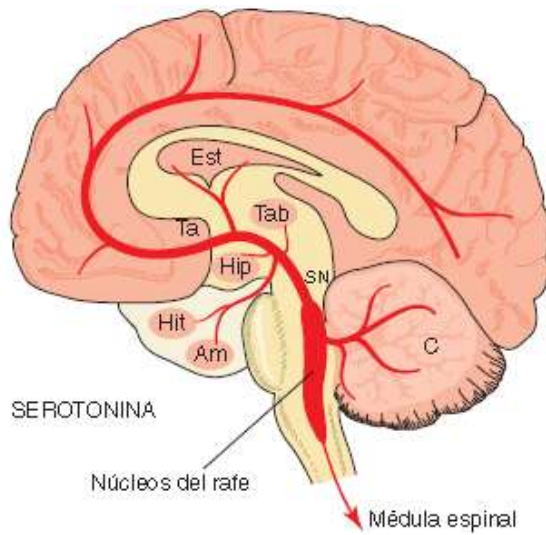


Figura 2. Vías de la 5-hidroxitriptamina (serotoninérgicas) en el encéfalo. Figura extraída de Rang y Dale, Farmacología (2008). Am: Núcleo amigdalino; C: Cerebelo; Est: Cuerpo estriado; Hip: Hipocampo; Hit: Hipotálamo; SN: Sustancia negra; Ta: Tálamo; Tab: Tabique.

## **1.2 El transportador de serotonina.**

El transportador de serotonina (SERT) es una proteína transmembranal encargada de recapturar la 5-HT del espacio extracelular (figura 3), y por lo tanto regula su disponibilidad en la sinapsis (Marston et al., 2011). SERT pertenece a la familia transportadora de solutos SLC6 (solute carrier family) dependientes de  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  y  $\text{K}^+$  (Lesch et al., 1993). El gen humano para SERT (*SLC6A4*) se encuentra en el cromosoma 17q11.2, se extiende a lo largo de 37.8 kb y contiene 14 exones, y codifica para una proteína de 630 aminoácidos (Rammamoorthy y Blakely, 1999). La secuencia de la proteína humana presenta una homología del 93% con la de ratón y rata.

Importantemente, SERT es la principal diana farmacológica para el tratamiento de las patologías psiquiátricas en las que el sistema 5-HTérgico se encuentra alterado, siendo el sitio de acción de los inhibidores de la recaptura de 5-HT como fluoxetina y citalopram (Chavez et al., 2008). SERT además es el sitio de acción de psicoestimulantes como la cocaína y anfetaminas (las que también actúan sobre el transportador de dopamina), (Rammamoorthy y Blakely, 1999).

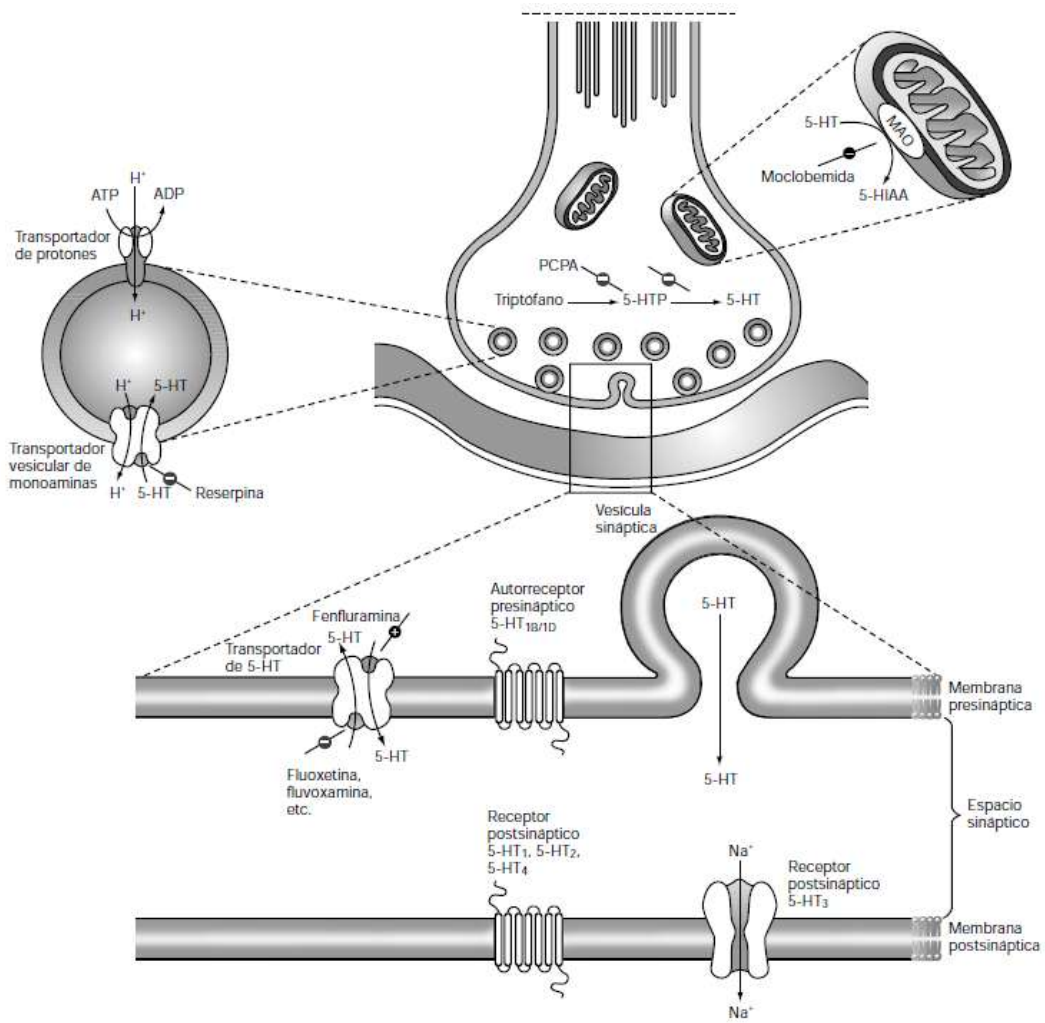


Figura 3. Sinapsis serotoninérgica y transportador de serotonina (SERT). Figura extraída Flores, J. farmacología humana (1997).

### **1.3 El ratón SERT Knockout como modelo de estudio**

En humanos, una variante corta del promotor del gen de SERT, ligada a una baja expresión de SERT, y que, conduce a una menor recaptura de 5-HT, ha sido asociada con rasgos de personalidad relevantes para ansiedad (Murphy y Moya, 2011), depresión (Caspi et al., 2003) y correspondientemente con patrones alterados de actividad y conectividad de regiones cerebrales (Hairiri et al., 2006). Con el fin de evaluar el papel de SERT *in vivo*, en el año 1998, se generaron ratones con niveles alterados de SERT a través de manipulación genética (fig. 4), (Bengel et al., 1998). El ratón deficiente de SERT (knockout, KO) muestra un aumento en la 5-HT extracelular de hasta 6 veces y una marcada disminución (60-80%) del contenido tisular de 5-HT en diversas regiones del cerebro (Bengel et al., 1998; Murphy et al., 2004). Como es de esperar para un tan dramático cambio en la homeostasis de 5-HT, los ratones SERT KO presentan alteraciones en la respuesta de los receptores de 5-HT pre y post-sinápticos. La mayoría de los receptores resultaron regulados a la baja (down-regulation), como consecuencia del aumento de 5-HT extracelular producido por la pérdida de función de SERT (Fabre et al., 2000, Fox et al., 2007). A nivel conductual, los ratones SERT KO presentan características importantes, tales como conductas tipo-ansiosa y tipo-depresivas (Lesch, 2008), alteraciones en sociabilidad (Moya et al., 2011; Sakabibara et al., 2014) y anormalidades morfológicas en corteza prefrontal y amígdala basolateral (Wellman et al., 2007).

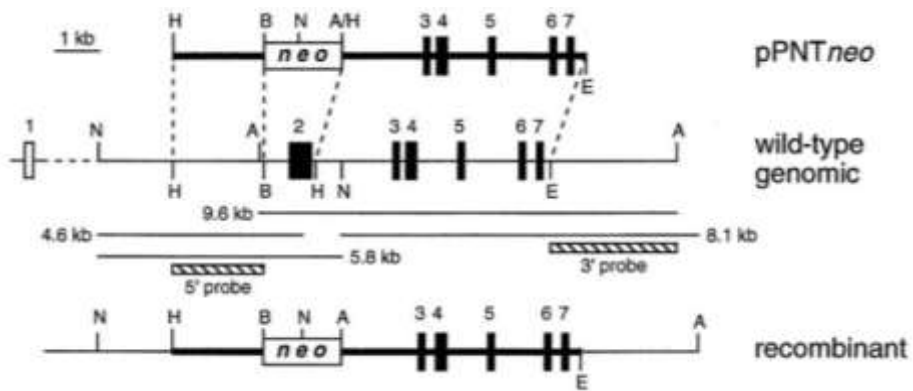


Figura 4. Recombinación genética del gen 5-HTT. El segmento de restricción neo ubicado en gen pPNTneo se une por complementariedad de bases en el gen WT. El resultado es un gen recombinante que no permite la traducción de la proteína SERT (5-HT transporter). Figura extraída de Bengel et al, Mol. Pharmacology 1998.

## **1.4 Serotonina y memoria**

Hay estudios que demuestran que la 5-HT desempeña un papel como moderador de diversos aspectos de las funciones cognitivas, incluyendo el aprendizaje y la memoria. Esto por su distribución en regiones del cerebro implicadas en el aprendizaje y la memoria, tales como el hipocampo, corteza y amígdala (Harvey, 2003; Herdegen y Leah, 1998). De este modo, se ha sugerido que el sistema 5-HTérgico, además de ser esencial para la función cerebral normal, también es importante en la patogénesis de algunos trastornos cognitivos (Meneses, 1999). Por ejemplo, trastornos como la Enfermedad de Alzheimer (EA) y la esquizofrenia presentan alteraciones cognitivas, y su etiología incluye, entre otras, una disfunción del sistema 5-HTérgico. (Terry et al., 2008). Por este motivo, es importante saber en mayor profundidad como SERT influye en las funciones cognitivas y cómo sus variantes genéticas se pueden ver involucradas.

La memoria se define, a nivel general, como la codificación, almacenamiento y la recuperación de la información aprendida (Kandel et al., 2012), y el aprendizaje como un cambio en el SNC que resulta de la experiencia y que origina cambios duraderos en la conducta que modifican un comportamiento posterior (Morgado, 2005). La memoria es esencial para todo el aprendizaje, ya que le permite almacenar y recuperar la información que se aprende. Por lo tanto aprendizaje y memoria son procesos estrechamente ligados y en cierto modo coincidentes. A nivel neuronal, múltiples líneas de evidencia indican que la formación de la memoria ocurre a través de una modificación en la eficacia sináptica (plasticidad sináptica), (Kandel, 2012). Los psicólogos han clasificado la memoria en dos grandes grupos. El primero, la memoria implícita (no declarativa) que es un tipo de

memoria que se recuerda de manera inconsciente. Es la información que se tiene para realizar algo. Este tipo de memoria aparece normalmente en el entrenamiento de capacidades reflejas motoras o perceptivas. El segundo, la memoria explícita (declarativa) que permite el conocimiento objetivo de las personas, los lugares y las cosas y lo que ello significa. Esto se recuerda mediante un esfuerzo consciente y deliberado (Kandel et al., 2012).

## **1.5 Paradigmas comportamentales de memoria y flexibilidad cognitiva**

La prueba de reconocimiento de objetos nuevos (NOR, por su sigla en inglés), es un modelo ampliamente utilizado para el estudio del aprendizaje y la memoria, la preferencia por la novedad y su influencia en diferentes regiones cerebrales (Antunes y Biala, 2012). La prueba NOR es muy útil para estudiar la memoria de reconocimiento de objetos (MRO), tanto a corto como largo plazo, a través de la manipulación del intervalo de retención entre sesiones, es decir, la cantidad de tiempo que los animales conservan la memoria de los objetos (Tagliabata et al., 2009).

La memoria espacial consiste en múltiples mecanismos especializados para codificar, almacenar y recuperar información acerca del ambiente y su orientación espacial (Aggleton et al., 2009). En este sentido, se ha descrito que la memoria espacial es una función dependiente del hipocampo (Bird y Burgess, 2008), mientras que la memoria de reconocimiento visual depende tanto del hipocampo como de la corteza perirrinal (Brown y Aggleton, 2001). Se acepta ampliamente que, tanto roedores como en primates, la corteza perirrinal juega un papel importante en la MRO (Aggleton et al., 2010), y cuando existe algún daño, el rendimiento en las tareas de memoria de reconocimiento se ve afectada (Albasser et al., 2009). Del mismo modo, las cortezas perirrinal, entorrinal, y temporal inferior, son críticas para la memoria de reconocimiento visual (Hammond et al., 2004). Por último, la memoria de reconocimiento de lugar (MRL), puede ser evaluada al cambiar de posición uno o más objetos durante la prueba NOR. En la prueba, los animales tienden a pasar más tiempo explorando el objeto ubicado en la nueva posición (Aggleton et al., 2009). Este tipo de memoria presenta una mayor carga de interferencia que una prueba

NOR “clásica”, que utiliza la MRO, debido a que los animales son sometidos a cambios contextuales de orden espacial (Uekita y Okanoya, 2011). Otras pruebas que miden memoria espacial son el laberinto de Barnes (BM) y el laberinto acuático de Morris (MWM), ambos relacionados con la memoria espacial. Estas pruebas han demostrado ser útiles en la detección de déficits cognitivos (Karabeg et al., 2013; Darcet et al., 2014).

Por otro lado, la flexibilidad cognitiva se define como la capacidad de cambiar rápidamente el comportamiento ante las circunstancias cambiantes del ambiente y está mediada por la corteza prefrontal (PFC), en particular, sus regiones orbitofrontal y ventromedial (Holmes y Wellman, 2009). Para estudiar la flexibilidad cognitiva, los investigadores utilizan a menudo un conjunto de paradigmas referidos colectivamente como el aprendizaje de reversión, que evalúan el desempeño respecto a modificar una conducta previamente aprendida al invertir o cambiar las claves u objetos utilizados durante el proceso de aprendizaje (Izquierdo et al., 2016).

## **1.6 Modelos animales de SERT en memoria y aprendizaje.**

En una serie de estudios previos se han evaluado distintos componentes cognitivos en los animales deficientes de SERT, incluyendo la MRO y la memoria espacial (Dere et al., 2005; Kalueff et al., 2007; Olivier et al., 2008). Por ejemplo, en relación a la MRO, la memoria para las ubicaciones en las que se exploraron los objetos, y la memoria de orden temporal para el objeto, se ha observado que los ratones SERT KO machos de 6 meses detectan simultáneamente los tres componentes de la novedad (Novedoso ¿qué?, memoria ubicación ¿Dónde? y memoria temporal ¿Cuándo? (Dere et al., 2005). Sin embargo, Kalueff y colaboradores encontraron diferencias significativas entre los genotipos de ratones SERT hembra adultos (3-5 meses). Estos autores observaron un aumento de la neofobia (menor número de aproximaciones para acercarse o tocar el objeto) en los ratones deficientes de SERT KO en comparación con los ratones WT en la prueba NOR durante 3 minutos (Kalueff et al., 2007).

Por otro lado, el grupo de Homberg investigó el efecto de la depleción aguda de triptófano (ATD) en ratas SERT (Olivier et al., 2008). Estos autores observaron que las ratas SERT KO y HET contenían niveles más bajos de 5-HT en la corteza y el hipocampo. También que estos genotipos son más vulnerables al consumir menos triptófano en su dieta (dosis baja de ATD), viéndose afectado los tiempos de exploración de objetos nuevos en la prueba de NOR, en comparación con ratas SERT WT (Olivier et al., 2008). En ensayos con ratones, Karaberg y colaboradores observaron un peor desempeño del ratón SERT KO en comparación con HET y WT en el MWM, pero no en el BM. Los autores argumentaron

que la diferencia entre ambos paradigmas se debe a que la prueba MWM incorpora un factor adicional de estrés por el miedo a ahogarse (Karaberg et al., 2013).

En otro estudio, se evaluó la memoria de trabajo espacial en ratones SERT adolescentes (4 semanas) y adultos jóvenes (8-10 semanas) usando el laberinto en forma de T. Los resultados obtenidos sugieren que hay un mayor porcentaje de alternancia espontánea en SERT HET y KO desde estadios tempranos del desarrollo (Sakakibara et al., 2014), aunque a los ratones SERT KO les toma más tiempo completar todos los ensayos en comparación con SERT WT (Sakakibara et al., 2014).

En un estudio de aprendizaje de reversión, el tratamiento crónico postnatal de ratones WT con fluoxetina, un bloqueante del transportador SERT, mejoró el aprendizaje de reversión basado en una tarea de aprendizaje inverso, específicamente durante la fase inicial de la tarea. Interesantemente, la delección de SERT también dio lugar a la mejora del aprendizaje de reversión. En este estudio se sometió a animales a pruebas con pantalla táctil (Brigman et al, 2010).

Por lo anteriormente descrito, mediante este estudio queremos esclarecer si la expresión de SERT afecta el reconocimiento de objetos tanto en la MRO como en la MRL en ratones SERT y ver los posibles efectos en la memoria a corto plazo. También saber si el impacto de la expresión de SERT en la memoria espacial afecta diferencialmente la memoria a corto plazo vs memoria a largo plazo en procesos de aprendizaje y flexibilidad cognitiva. Del mismo modo, el posible aumento en flexibilidad cognitiva por pérdida de expresión de SERT, descrito hasta la fecha en un único artículo y utilizando un solo paradigma de aprendizaje, no ha sido corroborado en otros paradigmas de memoria espacial, ni tampoco se ha evaluado diferencias entre memoria a corto y largo plazo.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

### **2.1 Hipótesis**

La reducción parcial (HET) o total (KO) de SERT afecta la memoria episódica y espacial a corto y largo plazo en ratones, disminuyendo los tiempos de exploración en la prueba de NOR y aumentando los tiempos y número de errores en la prueba de BM, además de mejorar el desempeño en el aprendizaje de reversión.

### **2.2 Objetivos**

#### **2.2.1 Objetivo general**

Evaluar la memoria episódica a corto y largo plazo en ratones SERT KO y HET, utilizando paradigmas de memoria de reconocimiento de objetos y memoria visuo-espacial.

#### **2.2.2 Objetivos específicos**

- Evaluar memoria de reconocimiento de objetos y memoria de reconocimiento espacial a corto plazo en ratones SERT, utilizando la prueba de reconocimiento de objetos NOR.
- Evalua memoria espacial en ratones SERT a corto y largo plazo en la prueba de Barnes Maze.
- Evaluar la flexibilidad cognitiva, en memoria espacial a corto y largo plazo.

### **3. METODOLOGÍA**

#### **3.1 Animales**

Se utilizaron ratones WT, SERT heterocigotos (HET) y KO. Estos animales son generados a través de una mutación por delección y una posterior recombinación homóloga, mediante la sustitución del segundo exón del gen SERT con un casete de neomicina (Bengel et al, 1998), (figura 4). Se utilizó un total de 25 ratones macho (9 KO, 6 HET y 10 WT) adultos, entre 8 a 12 semanas de edad, al comienzo de la prueba; esta edad se basa en evidencias en literatura que indican que el mayor impacto de SERT en conducta aparece en ratones de estado adulto (Sakabibara et al., 2014). Se agruparon de 4 a 6 ratones por jaula, las cuales son de policarbonato transparente, mantenidas en un sistema de ventilación individual. Las condiciones ambientales fueron controladas cuidadosamente, manteniendo a los animales bajo condiciones de luz estandarizadas (luz blanca desde 20:00 hasta 8:00; oscuridad desde 8:00 hasta 20:00), temperatura constante ( $20 \pm 2$  °C), y agua y comida *ad libitum* durante el período de habituación y tratamiento. Todas las pruebas se llevarán a cabo durante la fase de luz del ciclo. Los procedimientos de cuidado de los animales y las pruebas se realizaron según las normas aprobadas por el comité de bioética de la Universidad de Valparaíso.

### **3.2 Genotipificación**

La genotipificación se realizó utilizando muestras de tejido para extraer el ADN genómico amplificado por PCR. Posteriormente, los genotipos se identificaron por electroforesis en gel de fragmentos de ADN según tamaño 225 pb (WT), 272 pb (KO) o ambos (HET), usando un protocolo desarrollado en el laboratorio del Dr. Moya.

### 3.3 Pruebas conductuales

Los tres grupos de ratones fueron sometidos a tres pruebas de conducta de manera seriada y por una única vez y en el siguiente orden (figura 5).

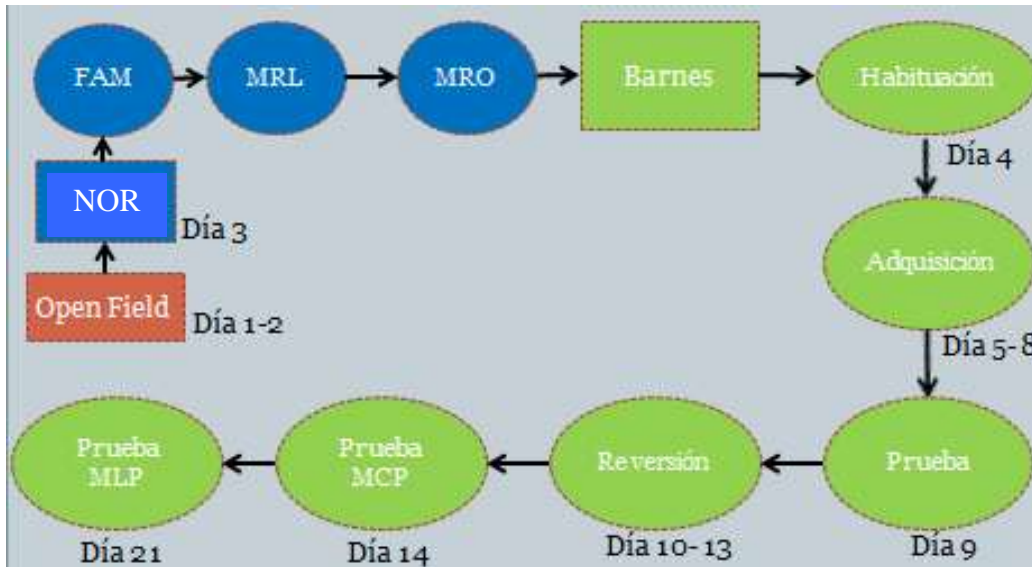


Figura 5. Resumen batería de pruebas realizadas por animal con sus respectivos tiempos. Son tres las pruebas que se realizaron por animal; Open Field (OF), Reconocimiento de Objetos Nuevos (NOR) y la prueba de Barnes Maze (BM). FAM: Familiarización; MRL: Memoria de Reconocimiento de Lugar; MRO: Memoria de Reconocimiento Objetos; MCP: Memoria a Corto Plazo; MLP: Memoria a Largo Plazo.

### **3.3.1 Tarea campo Abierto (Open field)**

Como parte del proceso de habituación de los animales durante la caracterización conductual, se utilizó la prueba del campo abierto previo a la prueba de reconocimiento de objetos, la que además permitió evaluar la actividad locomotora y la ansiedad que presentan los animales. El aparato de campo abierto es una caja de 40 cm x 40 cm de área y 30 cm de altura hecha de acrílico blanco opaco. Esta prueba está basada en el conflicto experimentado por los roedores entre su tendencia natural a permanecer en áreas protegidas (bordes) de la caja (tigmotaxis) vs explorar el área central abierta, lo que se interpreta como una conducta tipo-ansiosa. Antes de comenzar la prueba, se dejaron los animales en la sala de conducta por 30 minutos para su aclimatación, luego se evaluó el tiempo que pasa en el centro de la superficie o en la periferia durante 5 minutos. Cuanto más ansioso sea un animal menos va a deambular por el centro y más se va a quedar en la periferia. Se realizó un ensayo por día durante tres días consecutivos. El aparato fue limpiado cada vez que termine la medición con etanol al 30 % para minimizar señales químicas. Se midió un conjunto de parámetros como la distancia recorrida (cm), número de entradas y el porcentaje de tiempo de permanencia en el centro y en la periferia de la caja.

### **3.3.2 Tarea de reconocimiento de objetos (NOR)**

Esta prueba evalúa la capacidad de los roedores para reconocer un nuevo objeto y su ubicación espacial en el entorno. Esta prueba se fundamenta en la tendencia natural de los ratones a explorar nuevos objetos o que cambian de lugar en su ambiente y compararlos con otros que les son familiares (Antunes y Biala, 2012). Se llevaron a cabo las tareas de memoria como se describen a continuación, pero siguiendo una modificación en los protocolos (Uekita y Okanoya, 2011). La prueba se llevó a cabo con luz roja con una intensidad de 10 lux. Se utilizaron cinco conjuntos diferentes de objetos que no pudieron ser desplazados por los ratones. Los diferentes objetos fueron: (1) una pirámide de mármol color marfil de 4 cm largo, 4 cm ancho y 4 cm alto; (2) una manzana plástica color verde de 4 cm de diámetro y 4 cm de alto; (3) una caja plástica rellena con arena de 3 cm de largo, 2cm de ancho y 5 cm de alto;(4) un cilindro de vidrio bicolor (negro con naranja) de 3 cm de diámetro y 7 cm de alto; (5) un tornillo metálico plateado de 2,5 cm de diámetro y 6 cm de alto (Anexo figura 2). El aparato es una plataforma cuadrada de 40 cm x 40 cm de área y 30 cm de altura hecha de acrílico blanco opaco. Antes de comenzar la prueba, se dejaron los animales en la sala de conducta 30 minutos para su aclimatación.

El procedimiento consistió en una fase de habituación, una fase de familiarización y dos de prueba, ordenadas en el tiempo (figura 6). En la fase de habituación, se dejó explorar al animal libremente en la plataforma durante 10 minutos en ausencia de objetos y por dos días. La fase de familiarización se realizó veinticuatro horas después de la fase de habituación y se colocaron cuatro objetos distintos en la plataforma (A+B+C+D) a 5 cm de las paredes. Los animales se colocaron en la plataforma contra el centro de la pared opuesta de espaldas a los objetos, para impedir la coacción para explorar los objetos al ser

liberados. El tiempo de exploración fue de 5 minutos con tres sesiones consecutivas, separadas por intervalos de 5 minutos. La exploración de cada objeto durante la familiarización fue representada por el índice de preferencia (IP), ( $IP = \frac{\text{tiempo explorando el objeto}}{\text{suma tiempos de exploración de cada objeto}}$ ). En una primera etapa de prueba, 5 minutos después de la fase de familiarización, dos de los cuatro objetos presentados anteriormente fueron reposicionados (figura 6), evaluando así la memoria de objeto en cuanto a su ubicación; memoria de reconocimiento de lugar (MRL). La exploración de cada objeto durante la sesión de prueba fue representada por el índice de preferencia (IP). En la primera etapa de prueba se midió con la siguiente fórmula ( $IP = \frac{\text{tiempo dedicado a explorar los objetos reposicionados}}{\text{tiempo total dedicado a explorar todos los objetos}} \times 100$ ). La segunda etapa de prueba 5 minutos después de la primera prueba, se evaluó la memoria de reconocimiento de objetos, reemplazando uno de los cuatro objetos por uno nuevo (E+B+C+D). Se calculó el índice de preferencia ( $IP = \frac{\text{tiempo explorando el objeto nuevo}}{\text{tiempo explorando el objeto nuevo} + \text{tiempo explorando al objeto familiar}} \times 100$ ). Después de cada ensayo, la plataforma se limpió con etanol al 30%. Exploración de un objeto se consideró cuando el ratón olfatea o toca el objeto, es decir, cuando la distancia entre la nariz y el objeto es  $< 2$  cm. Dando la vuelta o si se sienta sobre el objeto no se consideró una conducta exploratoria.

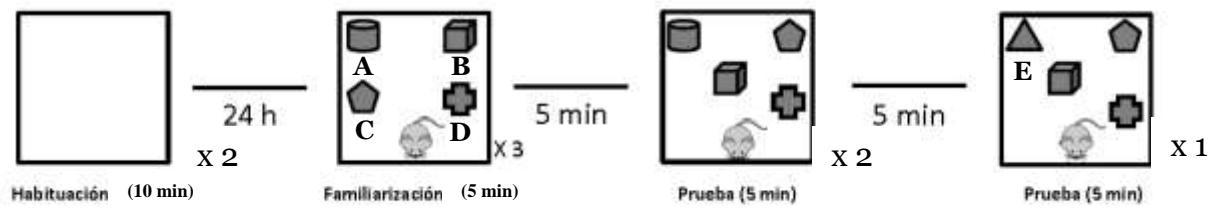


Figura 6. Tarea de reconocimiento de objetos nuevos. Los ratones fueron habituados dos días antes en la arena. Luego de 24 horas exploran 4 objetos distintos en 3 triales durante 5 minutos (familiarización). En la segunda etapa (prueba), dos objetos fueron cambiados de lugar (B y C), para medir la memoria de reconocimiento de lugar (MRL) en dos triales. Finalmente un objeto (A) fue cambiado por el (E), para evaluar la memoria de reconocimiento de objeto (MRO). (Modificada de Uekita y Okanoya, 2011).

### **3.3.3 Laberinto de Barnes**

El aparato consistió en un disco plano y circular (100 cm de diámetro), iluminado con 600 lx que se eleva a 120 cm por encima del suelo. Veinte agujeros fueron dispuestos de manera circular cerca del borde de la plataforma. Uno de los agujeros contiene una caja donde el animal puede escapar de la plataforma. La plataforma está dividida en 4 cuadrantes (blanco, opuesto, positivo y negativo), (figura 7). Los animales aprenden la ubicación de un agujero de escape utilizando puntos de referencia espacial que están fijos en relación al laberinto. Esta prueba aprovecha la preferencia natural de los roedores para evitar superficies abiertas y muy iluminadas. Por lo tanto no se necesitan estímulos aversivos adicionales. Este test es similar al Morris Water Maze (MWM), y evalúa la memoria de referencia espacial y el aprendizaje, pero sin inducir alguna conducta de desesperanza y estrés relacionada con el agua que pudiera estar presente en el MWM (Schulz et al., 2007).

El procedimiento consistió en una fase de habituación, dos fases de adquisición y tres pruebas, ordenadas en el tiempo (figura 7). En la fase de habituación el animal fue guiado por el experimentador al agujero de escape en oscuridad a modo que se familiarice con la prueba. La fase de adquisición se llevó a cabo los días 1 al 4 con la posición del agujero de escape de manera constante. Cada día se realizaron cuatro ensayos por animal con una duración de tres minutos y con intervalos de 25 minutos entre ellos, evaluando así la memoria a corto plazo (Sunyer, 2007). Cada ensayo se inició colocando el ratón en un cilindro oscuro (diámetro 12 cm; 12,5 cm de alto) en el centro de la plataforma (esto permite que el animal se enfrente a una dirección aleatoria cuando el cilindro se levantó). Después de 30 segundos, el cilindro se levantó y empieza la prueba. Si el ratón no entró en

al agujero de escape dentro de 300 segundos, se apagó la luz y el experimentador lo guió suavemente para que permanezca en él. Si el ratón entró al agujero de escape se apagó la luz y se cerró el agujero dejando al animal durante 60 segundos. Después de cada ensayo, la plataforma se limpió con etanol al 30%. El día 5 se realizó el test de prueba con un tiempo máximo de 2 minutos. En una segunda etapa se realizó un ensayo de reversión los días 6 al 9, girando en 180° la plataforma y quedando el agujero de escape en la posición opuesta. El día 10 se realizó un test de prueba para evaluar la memoria a largo plazo y finalmente al día 17 se realizó una tercera prueba para medir la consolidación de la memoria.

Se analizaron los siguientes parámetros:

- a) Latencia primaria: tiempo requerido por los animales para hacer contacto inicial con el orificio de destino.
- b) Latencia de escape: tiempo que tardaron los animales para entrar completamente en el agujero de destino.
- c) Errores primarios: número de agujeros visitados antes del primer contacto con el orificio de destino. Se consideró que un agujero es visitado cuando el animal inclinó su cabeza sobre él (nariz empuje) o introdujo sus patas en el orificio.

Por último la persona que realizó las mediciones de las tres pruebas de conducta de manera seriada fue siempre la misma, manteniendo las mismas condiciones durante las mediciones: la hora de inicio de los ensayos, protección en vestimenta (delantal, guantes, mascarilla, gorra y cubre zapatos), limpieza con toallas absorbentes y mediciones realizadas sin saber los genotipos de los animales.

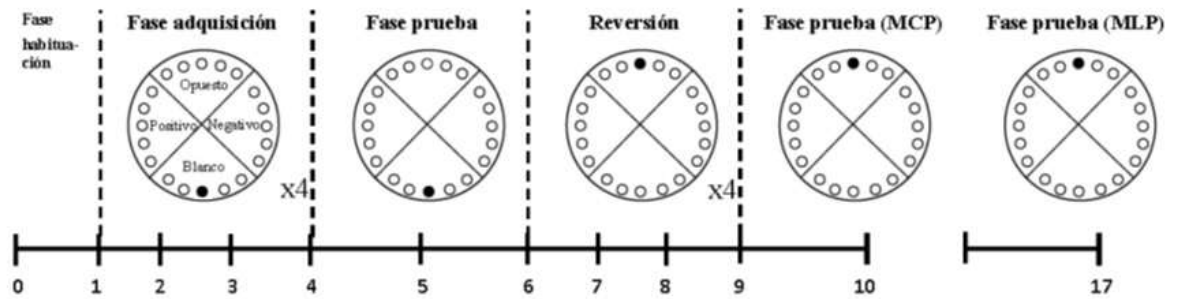


Figura 7. Barnes Maze. Los ratones pasan primero por una habituación que les permite familiarizarse con la prueba. La fase de adquisición se realizó durante cuatro días y cada día se realizaron 4 triales por animal (MCP). La fase de prueba se realizó en un solo día. Del día 6 en adelante se cambió la posición del agujero de escape para así evaluar el aprendizaje de reversión. La reversión fue medida igual que la fase de prueba. En el día 10 se midió la memoria a largo plazo (MLP) y luego de una semana la consolidación del aprendizaje. (Modificada de Darcet et al., 2014).

### 3.4 Software y análisis estadístico

Todos los ensayos se grabaron utilizando el programa Microsoft LifeCam. Para el análisis cuantitativo de los registros de video, se utilizó el programa ANY-Maze. Los datos obtenidos fueron analizados con el software GraphPad. Todos los resultados fueron expresados como el promedio  $\pm$  error estándar, y comparados mediante Análisis de Varianza seguido por test *post-hoc* correspondiente. Para comparar los genotipos SERT en la prueba BM, se calculó el área bajo la curva del aprendizaje (AuC), en la fase de adquisición y reversión, para cada individuo. Los AuC calculados fueron expresados como el promedio  $\pm$  error estándar, y comparados mediante Análisis de Varianza seguido por test *post-hoc* correspondiente.

#### **4. RESULTADOS**

Para establecer si la ausencia de SERT induce déficits en la memoria y el aprendizaje, realizamos una caracterización conductual utilizando pruebas conductuales que evalúan la memoria de reconocimiento y la memoria espacial.

#### 4.1 Test de campo Abierto (Open field)

Tal como se había descrito previamente (Kallueff et al., 2006), observamos el efecto del genotipo sobre la distancia recorrida a través de los grupos experimentales; One-way ANOVA  $F_{(2,21)}$ ,  $P = 0.0166$ . El análisis de comparación múltiple nos indica que el grupo KO recorrió una distancia significativamente menor al grupo WT (test Dunnett,  $P < 0.05$ ). (Figura 8).

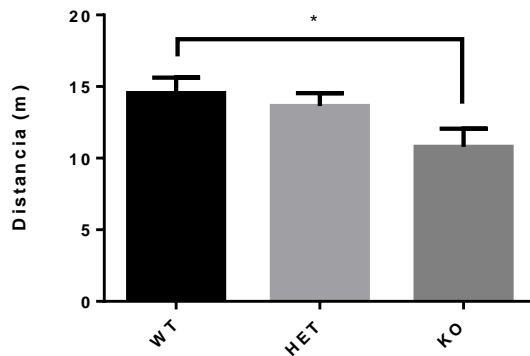


Figura 8. Distancia recorrida OF. Distancia recorrida en el campo abierto (OF) por los tres grupos durante un tiempo de 5 minutos. Los datos están representados como media  $\pm$  SEM. One-way ANOVA  $F_{(2,21)}$ , seguido de Dunnett *post-hoc* test. ( $*P < 0.05$ ); (WT: n=10; HET: n=6 y KO: n=9).

Tal como se describen en los trabajos de (Sakabibara, 2014) y (Darcet et al., 2014), el tiempo de permanencia de los animales en el centro de la arena disminuye en el grupo KO en comparación a los grupos HET y WT. Sin embargo, el análisis de comparación múltiple nos muestra que esta diferencia no fue significativa entre los distintos grupos evaluados en esta tesis (test Dunnett); One-way ANOVA  $F_{(2,21)}$ ,  $P = 0.1549$  (Figura 9).

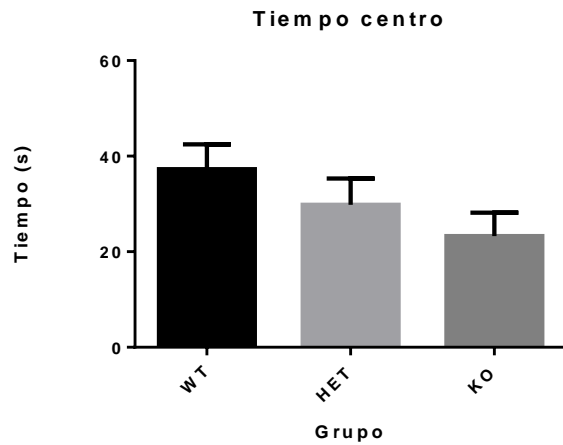


Figura 9. Tiempo centro OF. Tiempo empleado en la zona central de la arena por los tres grupos durante un tiempo total de 5 minutos. Los datos están representados como media  $\pm$  SEM. One-way ANOVA  $F_{(2,21)}$ , seguido de Dunnett *post-hoc* test. (WT: n=10; HET: n=6 y KO: n=9).

## 4.2 Tarea de reconocimiento de objetos nuevos (NOR)

Un tipo de memoria afectada por la ausencia de SERT es la memoria de reconocimiento, la cual ha sido evaluada usando el clásico paradigma de reconocimiento de objetos nuevos (NOR) que utiliza dos objetos para discriminar entre lo novedoso y lo familiar (Kalueff et al., 2007). A fin de evaluar una tarea más compleja, estimando no sólo la memoria de reconocimiento de objetos si no también la memoria de reconocimiento de lugar (MRL), utilizamos una versión que utiliza 4 objetos diferentes la cual ha sido previamente empleada usando otros modelos animales como degus y ratas (Uekita et al., 2011; Arias-Cavieres et al., 2017) pero no en ratones. En la primera etapa de la prueba, etapa de familiarización, observamos una menor exploración de objetos en el grupo KO en comparación a los grupos HET y WT durante los tres triales; Two-way ANOVA  $F_{(4,66)}$ ,  $P = 0.6962$  (Figura 10a). No obstante, el análisis de comparación múltiple nos muestra una diferencia significativa en el trial 3 entre el grupo KO y HET (test Tukey,  $P < 0.05$ ), no así con respecto al grupo WT. Además no se observó preferencia por algún objeto en particular en esta etapa de la prueba (Two-way ANOVA  $F_{(2,83)}$ ,  $P = 0.7728$  seguido de test Tukey,  $P > 0,05$ ), (Anexo Figura 3). En la segunda etapa de prueba, que evaluó la MRL, no observamos una discriminación entre objetos movidos (objetos B y C en Figura 2, metodología) versus no movidos, tal como el análisis de comparación múltiple nos muestra (Two-way ANOVA  $F_{(2,44)}$ ,  $P = 0.8594$ , seguido test Sidak's,  $P > 0,05$ ); (Figura 10b). Al comparar la exploración de los objetos movidos y no movidos en los distintos grupos no observamos una discriminación entre ellos, tal como el análisis de comparación múltiple

nos muestra (Two-way ANOVA  $F_{(2,44)}$ ,  $P$  value = 0.0509, seguido test Tukey's,  $P > 0,05$ ), (Figura 10b).

Por último, con respecto a la MRO, se observó una menor exploración del objeto cambiado en comparación a los objetos no cambiados para los grupos KO y HET (objetos E en figura 6, metodología), no así en el grupo WT. Sin embargo el análisis de comparación múltiple nos muestra que la diferencia no fue significativa (Two-way ANOVA  $F_{(2,44)}$ , seguido test Tukey's  $P > 0,05$ ), (Figura 10c). Al comparar la exploración del objeto cambiado en los distintos grupos no observamos una discriminación entre ellos, sin embargo si fue observada en los objetos no cambiados entre los grupos HET y KO, tal como el análisis de comparación múltiple nos muestra (Two-way ANOVA  $F_{(2,44)}$ ,  $P = 0.0406$ , seguido test Tukey's  $> 0,05$ ), (Figura 10c).

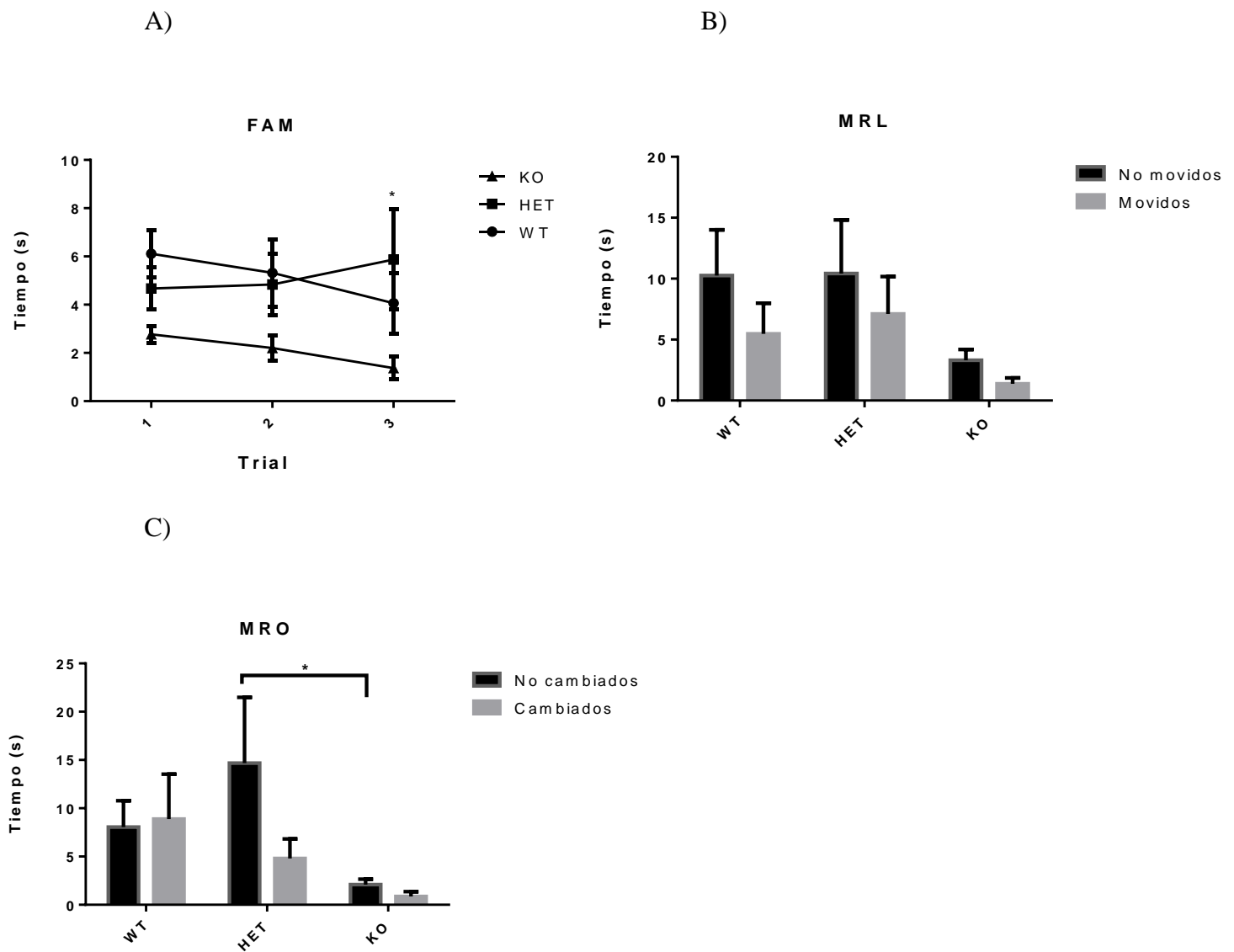


Figura 10. Tarea de reconocimiento de objetos. a) Etapa de familiarización. Los datos están representados como media  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA  $F_{(4,66)}$ ,  $P = 0.6962$  seguido de Tukey's post-hoc test  $P < 0.05$ . b) Memoria de reconocimiento de lugar. Los datos están representados como media  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA  $F_{(2,44)}$ ,  $P = 0.8594$ , seguido de Tukey's post-hoc test  $P < 0.05$ . c) Memoria de reconocimiento de objetos. Los datos están representados como media  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA  $P_{(2,44)}$ , seguido de Tukey's post-hoc test. ( $*P < 0.05$ ); (WT: n=10; HET: n=6 y KO: n=9).

### **4.3 Laberinto de Barnes (BM)**

Para evaluar el aprendizaje visuo-espacial a través de este paradigma conductual, se midieron tres parámetros; latencia primaria, latencia de escape y los errores primarios.

### 4.3.1 Latencia Primaria

Al analizar el tiempo en que los animales detectan el agujero de escape en los cuatro triales durante la etapa de adquisición (día 1 al 5), se observa una interacción significativa entre los grupos (Two-way ANOVA  $F_{(2,365)}$ ,  $P = 0.0015$ ; Figura 11a). Así mismo, al graficar el área bajo la curva del aprendizaje (AuC), se observa una diferencia significativa entre los grupos (One-way ANOVA  $F_{(2,22)}$ ,  $P = 0.0260$ ; Figura 11b). El grupo KO tuvo un peor desempeño del aprendizaje en comparación con los grupos WT y HET. El análisis de comparación múltiple nos muestra una diferencia significativa del aprendizaje entre el grupo KO y HET, no así entre el grupo WT y KO (test Tukey's,  $P < 0.05$ ; Figura 11b).

En la segunda etapa del aprendizaje; etapa reversión (día 6 al 17), se observa una interacción significativa entre los grupos (Two-way ANOVA  $F_{(2,379)}$ ,  $P = 0.0113$ ; Figura 11c). Al graficar el área bajo la curva del aprendizaje (AuC), se observa una diferencia significativa entre los grupos (One-way ANOVA  $F_{(2,22)}$ ,  $P = 0.0211$ ; Figura 11d). El análisis de comparación múltiple nos muestra una diferencia significativa del aprendizaje entre los grupo WT/HET y los grupos HET/KO, no así entre los grupos WT/KO (test Tukey's,  $P < 0.05$ ; Figura 11d).

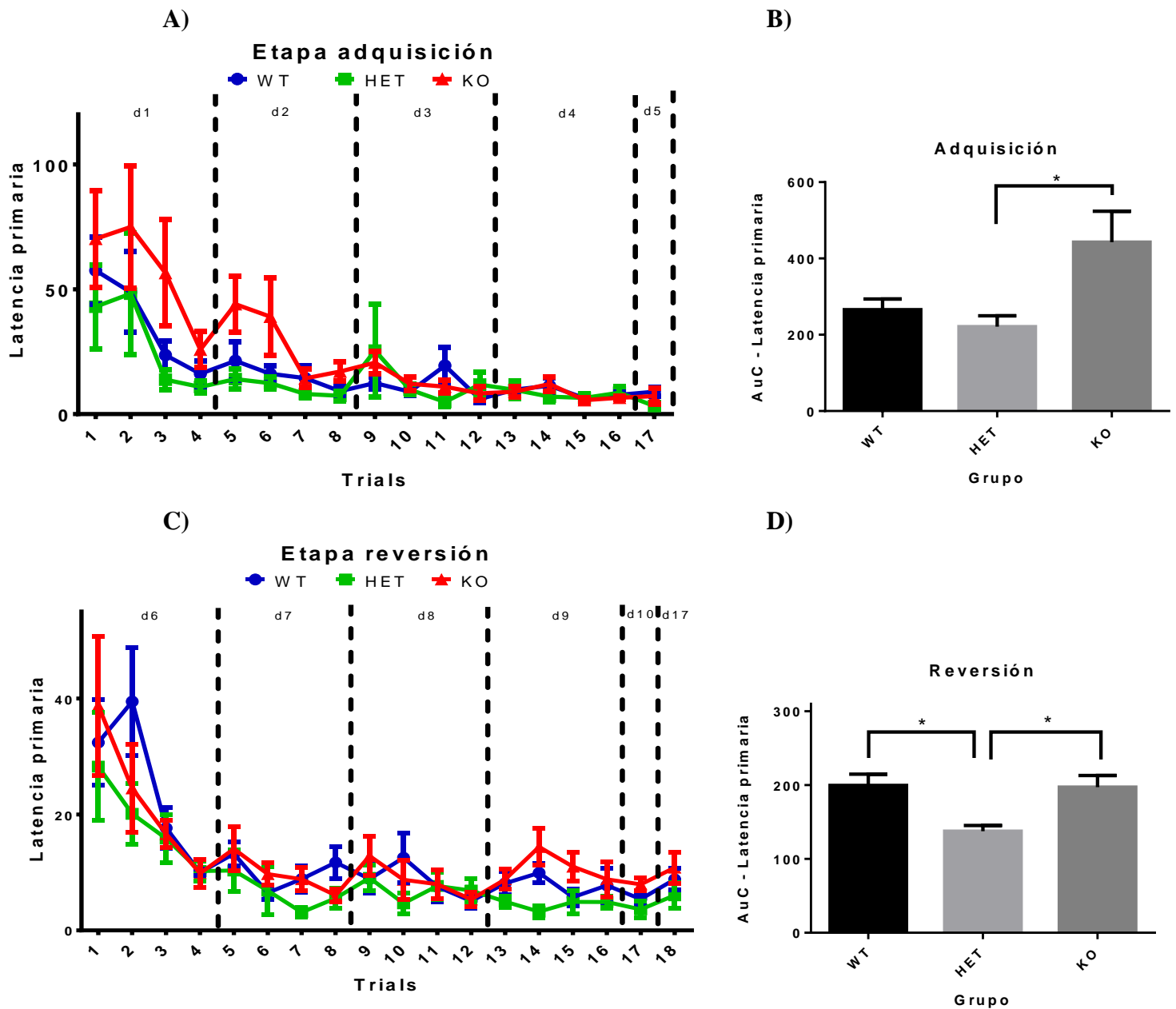


Figura 11. Latencia primaria. A) Curva aprendizaje etapa adquisición. B) Área bajo la curva aprendizaje (AuC) etapa adquisición. C) Curva aprendizaje etapa reversión. D) Área bajo la curva aprendizaje (AuC) etapa de reversión. Los datos están representados como media  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA  $F_{(2,365)}$  gráfico A;  $F_{(2,22)}$  gráfico B;  $F_{(2,379)}$  gráfico C;  $F_{(2,22)}$  gráfico D, seguido de Tukey's post-hoc test. (\* $P < 0.05$ ); (WT:  $n=10$ ; HET:  $n=6$  y KO:  $n=9$ ).

Al analizar el tiempo en que los animales detectan el agujero de escape en los cuatro trials, solo se observan diferencias significativas en los días uno y dos (Anexo Figura 6 a, c y d). Se observa sin embargo, que durante la etapa de adquisición (días 1 al 4), hay una disminución en los tiempos de reconocimiento del agujero de escape a medida que pasan los días incluyendo el día 5 en el trial 1 para todos los grupos. Por otro lado, apreciamos un aumento en el tiempo de reconocimiento del agujero de escape en el día 6 (reversión) al compararlo con el día de prueba (día 5) o el último día de adquisición (día 4) previo al cambio de posición, consistente con el aprendizaje de una nueva ubicación del agujero de escape. Al igual que en la etapa de adquisición, observamos en la fase de reversión (días 6 al 9) una disminución en los tiempos de reconocimiento del agujero de escape a medida que pasan los días (Anexo Figura 6).

Específicamente, en el trial 1 no se observa una interacción significativa entre los grupos. Two-way ANOVA  $F_{(2,231)}$ ,  $P = 0.0506$ . En el análisis de comparación múltiple solo se observó una diferencia significativa en el día 1 y 2 entre el grupo KO y HET, no así entre el grupo WT y KO (test Tukey,  $P < 0.05$ ; Anexo Figura 6a).

En el trial 2 no se observa una interacción significativa entre los grupos (Two-way ANOVA  $F_{(2,170)}$ ,  $P = 0.1174$ ). En el análisis de comparación múltiple no se observan diferencias significativas (test Tukey  $> 0.05$ ; Anexo Figura 6b).

En el trial 3 se observa una interacción significativa entre los grupos (Two-way ANOVA  $F_{(2,171)}$ ,  $P = 0.0332$ ). En el análisis de comparación múltiple solo se observó una diferencia

muy significativa en el día 1 entre los grupos WT/KO (test Tukey,  $P < 0.001$ ) y HET/KO (test Tukey,  $P < 0.0001$ ; Anexo Figura 6c).

Finalmente en el trial 4 no se observa una interacción significativa entre los grupos (Two-way ANOVA  $F_{(2,172)}$ ,  $P = 0.2015$ ). En el análisis de comparación múltiple se observó una diferencia significativa en el día 1 entre los grupos KO/WT (test Tukey,  $P < 0.05$ ) y KO/HET (test Tukey,  $P < 0.01$ ; Anexo Figura 6d). Estos últimos resultados nos sugieren que efectivamente hay un peor desempeño del aprendizaje del grupo KO y que las mayores diferencias están presentes en los dos primeros días de la prueba.

Al comparar el primer día de adquisición con el día de prueba (día 5), se observa que los tiempos para encontrar el agujero de escape disminuyen en todos los grupos (Figura 12a). Se observa una interacción muy significativa en los grupos (Two-way ANOVA  $F_{(1,43)}$ ,  $P < 0.0001$ ). El análisis de comparación múltiple arroja una diferencia significativa en el grupo WT (test Sidak's,  $P < 0.05$ ) y muy significativa en el grupo KO (test Sidak's,  $P < 0.01$ ).

Al comparar el día de prueba (día 5) con el primer día de reversión (día 6), se observa un aumento de tiempo en los tres grupos (Figura 12b). Se observa una interacción muy significativa entre los grupos (Two-way ANOVA  $F_{(1,42)}$ ,  $P < 0.0001$ ). El análisis de comparación múltiple arroja una diferencia significativa en el grupo WT (test Sidak's,  $P < 0.05$ ) y una diferencia muy significativa en el grupo KO (test Sidak's,  $P < 0.01$ ).

Finalmente al comparar el primer día de reversión (día 6), con la prueba de reversión a corto y largo plazo (día 10 y 17), se aprecia una disminución en los tiempos en todos los grupos (Figura 12c). Se observa una interacción muy significativa entre los grupos. ANOVA  $F_{(2,59)}$ ,  $P < 0.0001$ . El análisis de comparación múltiple entre los días 6 y 10 arroja diferencias muy significativas en los grupos WT y KO (test Tukey's,  $P < 0.01$ ) y significativas en el grupo HET (test Tukey's,  $P < 0.05$ ). En el caso de los días 6 y 17 se ven diferencias muy significativas en el grupo KO (test Tukey's,  $P < 0.01$ ) y significativa en el grupo WT (test Tukey's,  $P < 0.05$ ). Estos resultados sugieren que existe un aprendizaje a largo plazo en todos los genotipos tanto en la etapa de adquisición como de reversión, además que los grupos se dan cuenta del cambio de posición del escape.

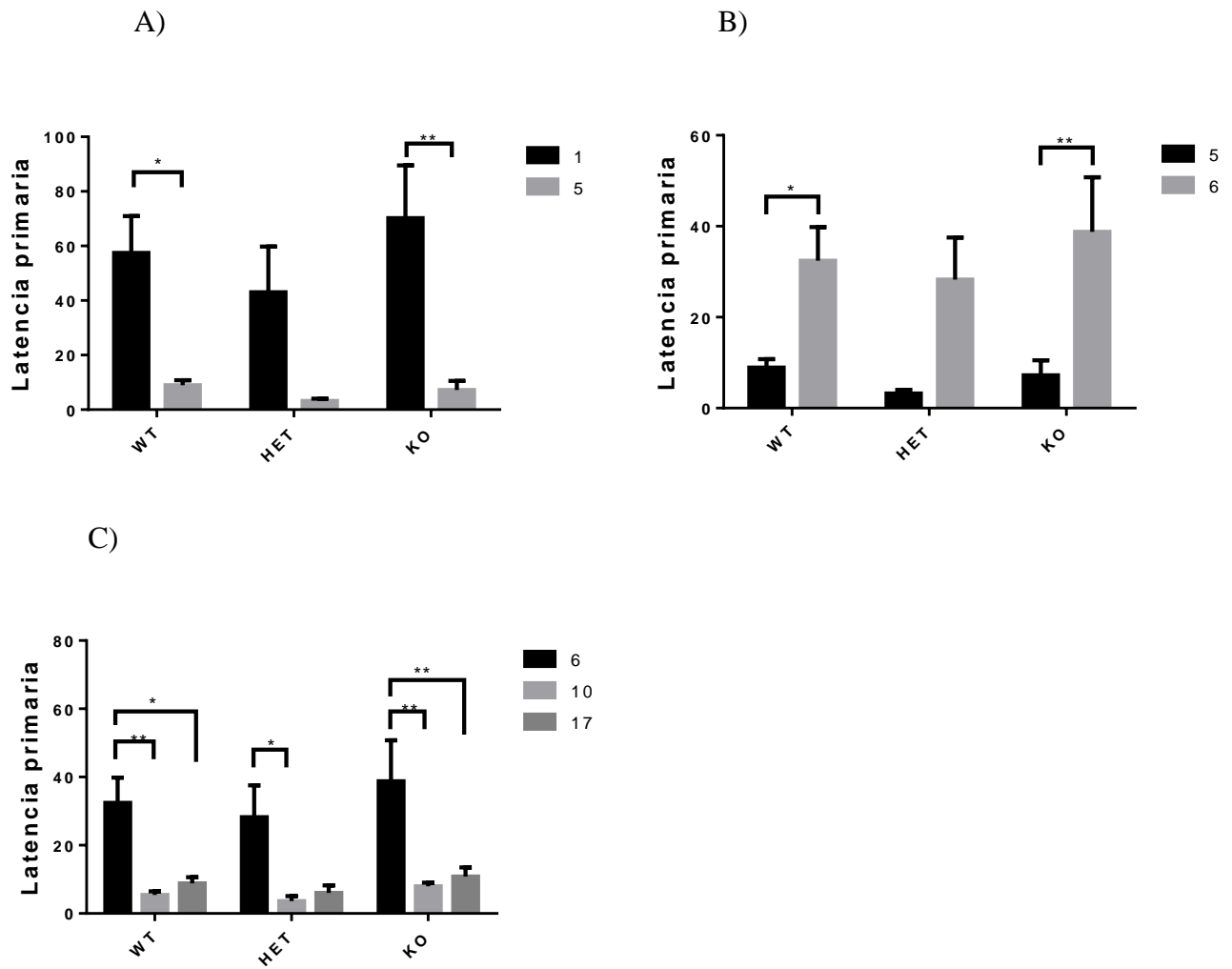


Fig. 12. Latencia primaria. A) primer día de adquisición v/s día de prueba. B) Día de prueba v/s primer día reversión. (c) primer día de prueba etapa reversión v/s MLP día 10 y 17. Los datos están representados como media  $\pm$  SEM Two-way ANOVA  $F_{(1,43)}$  gráfico A y B;  $F_{(2,59)}$  gráfico C, seguido de test Sidak's post-hoc test. (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ). (WT: n=10; HET: n=6 y KO: n=9).

Los tiempos empleados en la latencia primaria disminuyen al comparar los triales 1 y 4 en todos los grupos (Figura 13 a, b y c). En el grupo WT se observa una interacción muy significativa entre los triales (Two-way ANOVA  $F_{(1,139)}$ ,  $P < 0.0001$ ). En el análisis de comparación múltiple, se observan diferencias significativas en el día 1 ( $P < 0,0001$  test Sidak's) y en el 6 ( $P < 0,01$  test Sidak's; Figura 13a). En el grupo HET se observa una interacción muy significativa entre los triales (Two-way ANOVA  $F_{(1,80)}$ ,  $P < 0.0001$ ). En el análisis de comparación múltiple se observa una diferencia significativa solo en el día 1 ( $P < 0,05$  test Sidak's; Figura 13b). Finalmente en el grupo KO se observa una interacción muy significativa entre los triales (Two-way ANOVA  $F_{(1,125)}$ ,  $P < 0.0001$ ). El análisis de comparación múltiple se observa diferencias muy significativas en el día 1 ( $P < 0,001$ ) y significativas en el 6 ( $P < 0,05$  test Sidak's; Figura 13c). Estos resultados sugieren un aprendizaje a corto plazo en todos los grupos y vemos un mejor desempeño a medida que avanzan los días en las etapas de adquisición y reversión.

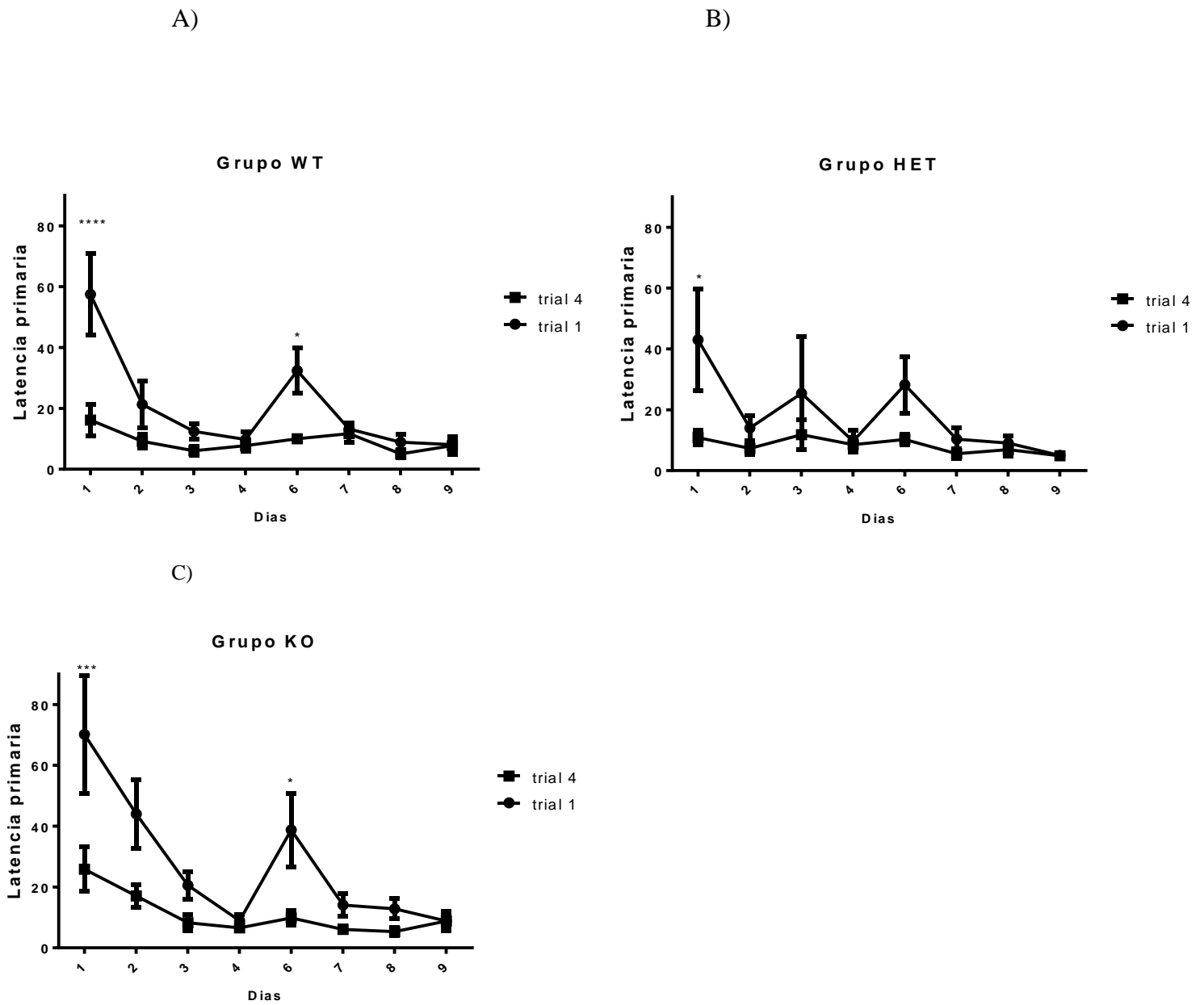


Figura 13. Latencia primaria triales 1 y 4. A) Grupo WT. B) grupo HET. C) Grupo KO. Los datos están representados como media  $\pm$  SEM Two-way ANOVA  $F_{(1,122)}$  gráfico A;  $F_{(1,80)}$  gráfico B y  $F_{(1,137)}$  gráfico C, seguido de test Sidak's post-hoc test. ( $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ ;  $***P < 0.001$ ;  $****P < 0.0001$ ). (WT: n=10; HET: n=6 y KO: n=9).

### 4.3.2 Latencia Escape

Al analizar el tiempo en que los animales escapan de la plataforma en los cuatro trials durante la etapa de adquisición (día 1 al 5), se observa una interacción significativa entre los grupos (Two-way ANOVA  $F_{(2,364)}$ ,  $P < 0.0001$ ; Figura 14a). Al graficar el área bajo la curva del aprendizaje (AuC), se observa una diferencia significativa entre los grupos (One-way ANOVA  $F_{(2,22)}$ ,  $P = 0.006$ ; Figura 14b). Tal como esperábamos, el grupo KO tuvo un menor desempeño del aprendizaje en comparación con los grupos WT y HET. El análisis de comparación múltiple nos muestra una diferencia significativa del aprendizaje entre el grupo KO/HET (test Tukey's,  $P < 0.01$ ) y entre el grupo KO/WT (test Tukey's,  $P < 0.01$ ), no así entre el grupo WT/HET (Figura 14b).

En la segunda etapa del aprendizaje; etapa reversión (día 6 al 17), se observa una interacción significativa entre los grupos (Two-way ANOVA  $F_{(2,382)}$ ,  $P < 0.001$ ; Figura 14c). Al graficar el área bajo la curva del aprendizaje (AuC), se observa una diferencia significativa entre los grupos (One-way ANOVA  $F_{(2,22)}$ ,  $P = 0.0010$ ; Figura 14d). El análisis de comparación múltiple nos muestra una diferencia significativa del aprendizaje entre el grupo WT/KO y el grupo HET/KO (test Tukey's,  $P < 0.01$ ), no así entre el grupo WT/HET (Figura 14d).

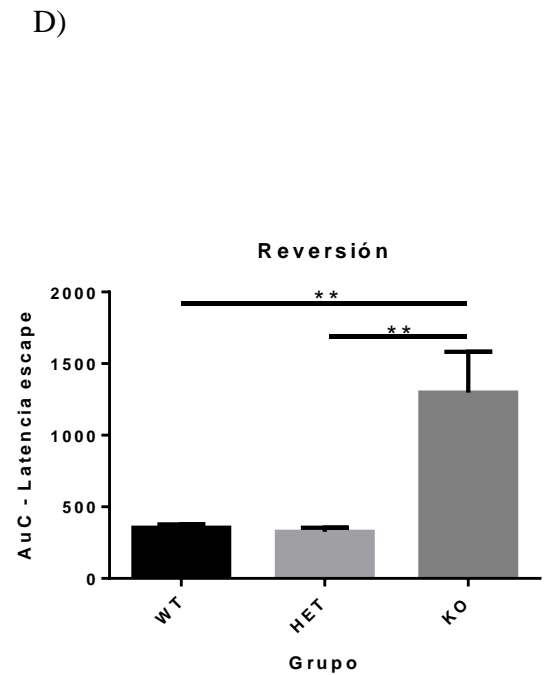
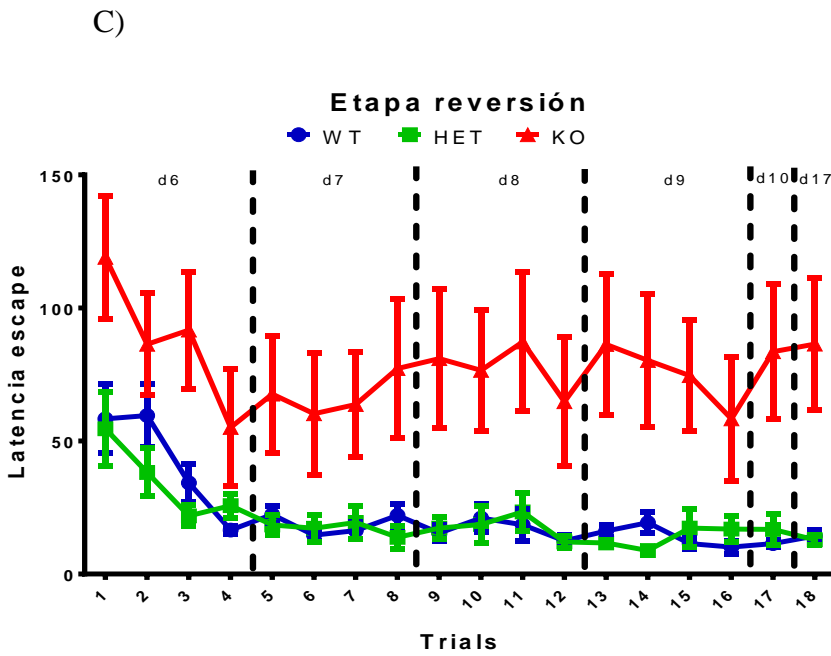
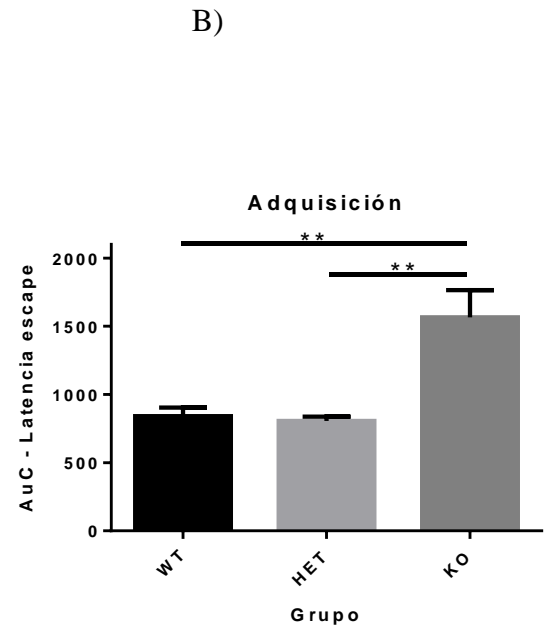
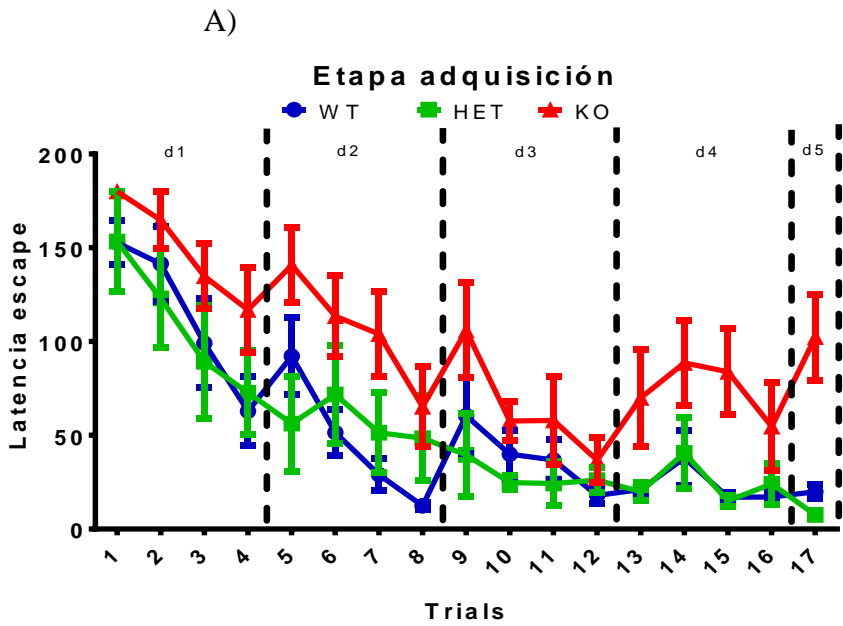


Fig. 14. Latencia escape. A) Curva aprendizaje etapa adquisición. B) Área bajo la curva aprendizaje (AuC) etapa adquisición. C) Curva aprendizaje etapa reversión. D) Área bajo la curva aprendizaje (AuC) etapa de reversión. Los datos están representados como media  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA  $F_{(2,364)}$  gráfico A;  $F_{(2,22)}$  gráfico B;  $F_{(2,382)}$  gráfico C;  $F_{(2,22)}$  gráfico D, seguido de Tukey's post-hoc test. (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ); (WT:  $n=10$ ; HET:  $n=6$  y KO:  $n=9$ ).

A diferencia de la latencia primaria, que mide el tiempo en que encuentran el agujero de escape, el parámetro de latencia de escape mide el tiempo en que los animales efectivamente escapan de la plataforma al ingresar al agujero. Al graficar este parámetro en los cuatro triales, se observan una gran diferencia en el grupo KO, el cual le tomó más tiempo para completar la prueba (Anexo Figura 7 a, b, c y d). Se observa que durante la etapa de adquisición (días 1 al 4), hay una disminución en los tiempos de escape a medida que pasan los días incluyendo el día 5 en el trial 1 para los grupo HET y WT. Sin embargo en el caso del grupo KO, esta disminución solo se dio en el trial 1, desde el día 1 hasta el día 4 y aumentó en el día 5. En los triales 2, 3 y 4 se observó esta disminución solo hasta el día 3 aumentando luego al el día 4. Por otro lado, apreciamos en general un aumento en el tiempo de reconocimiento del agujero de escape en el día 6 (reversión) al compararlo con el día de prueba o el último día de adquisición (día 4), consistente con el aprendizaje de una nueva ubicación del agujero de escape. Al igual que en la etapa de adquisición, observamos en la fase de reversión (días 6 al 9) una disminución en los tiempos de escape a medida que pasan los días en los grupos HET y WT, no así para el grupo KO, el cual mantiene tiempos más elevados y constantes que los demás grupos, confirmando su dificultad para esta prueba. También se observa una disminución general de los tiempos a medida que transcurren los triales durante los días sucesivos en los grupos HET y WT, pero no en el caso del grupo KO (Anexo Figura 7). Esto indicaría que existe una memoria a corto plazo que se vería afectada por el genotipo de SERT-KO.

Específicamente en el trial 1 se observa una interacción muy significativa entre los grupos (Two-way ANOVA  $F_{(2,233)}$ ,  $P < 0.0001$ ). En el análisis de comparación múltiple se observó diferencias significativas en la mayoría de los días entre los grupos KO/HET y KO/WT (test Tukey,  $P < 0.05$ ; Anexo Figura 7a).

En el trial 2 se observa una interacción muy significativa entre los grupos (Two-way ANOVA  $F_{(2,172)}$ ,  $P < 0.0001$ ). En el análisis de comparación múltiple se observó diferencias significativas en los días 2, 8 y 9 entre los grupos KO/WT y el día 9 entre los grupos KO/HET (test Tukey,  $P < 0.05$ ; Anexo Figura 7b).

En el trial 3 se observa una interacción muy significativa entre los grupos (Two-way ANOVA  $F_{(2,170)}$ ,  $P < 0.0001$ ). En el análisis de comparación múltiple se observó diferencias significativas en la mayoría de los días entre los grupos KO/HET y KO/WT (test Tukey,  $P < 0.05$ ; Anexo Figura 7c).

En el trial 4 se observa una interacción muy significativa entre los grupos (Two-way ANOVA  $F_{(2,171)}$ ,  $P < 0.0001$ ). En el análisis de comparación múltiple se observó diferencias significativas en los días 1, 2 y 7 entre los grupos KO/WT y el día 7 y 8 entre los grupos KO/HET (test Tukey,  $P < 0.05$ ; Anexo Figura 7d). Estos últimos resultados nos confirman que efectivamente hay un peor desempeño del aprendizaje a largo plazo del grupo KO.

Al comparar el primer día de adquisición con el día de prueba (día 5), se observa que los tiempos para escapar del agujero disminuyen en todos los grupos (Figura 15a). Se observa un factor muy significativo entre los grupos (Two-way ANOVA  $F_{(1,43)}$ ,  $P < 0.0001$ ). El análisis de comparación múltiple arroja una diferencia muy significativa en los grupos WT y HET (test Sidak's,  $P < 0.0001$ ) y KO (test Sidak's,  $P < 0.001$ ). Esto confirmaría la existencia de un aprendizaje a largo plazo en todos los grupos, independiente del genotipo SERT.

Al comparar el día de prueba con el primer día de reversión se observa un aumento de tiempo en los tres grupos, sin embargo se observa que el grupo KO este aumento fue muy pequeño en comparación con los demás grupos (Figura 15b). Se observa una diferencia significativa entre los días (Two-way ANOVA  $F_{(1,43)}$ ,  $P = 0.0207$ ). Esto indicaría que todos los grupos se dan cuenta del cambio tipo espacial.

Finalmente al comparar el primer día de reversión (día 6), con el día de prueba a largo plazo (día 10 y 17), se aprecia una disminución en los tiempos en todos los grupos (Figura 15c). Se observan diferencias significativas entre los días (Two-way ANOVA  $F_{(2,61)}$ ,  $P = 0.0112$ ). Sin embargo no se observan diferencias significativas en los grupos (Two-way ANOVA  $F_{(2,60)}$ ,  $P = 0.0546$ ; test Sidak's,). Cabe destacar que el grupo KO esta diferencia fue menor que en los demás grupos. Estos resultados indicarían que hay un aprendizaje en todos los grupos en la primera etapa de adquisición, no así en el aprendizaje de reversión.

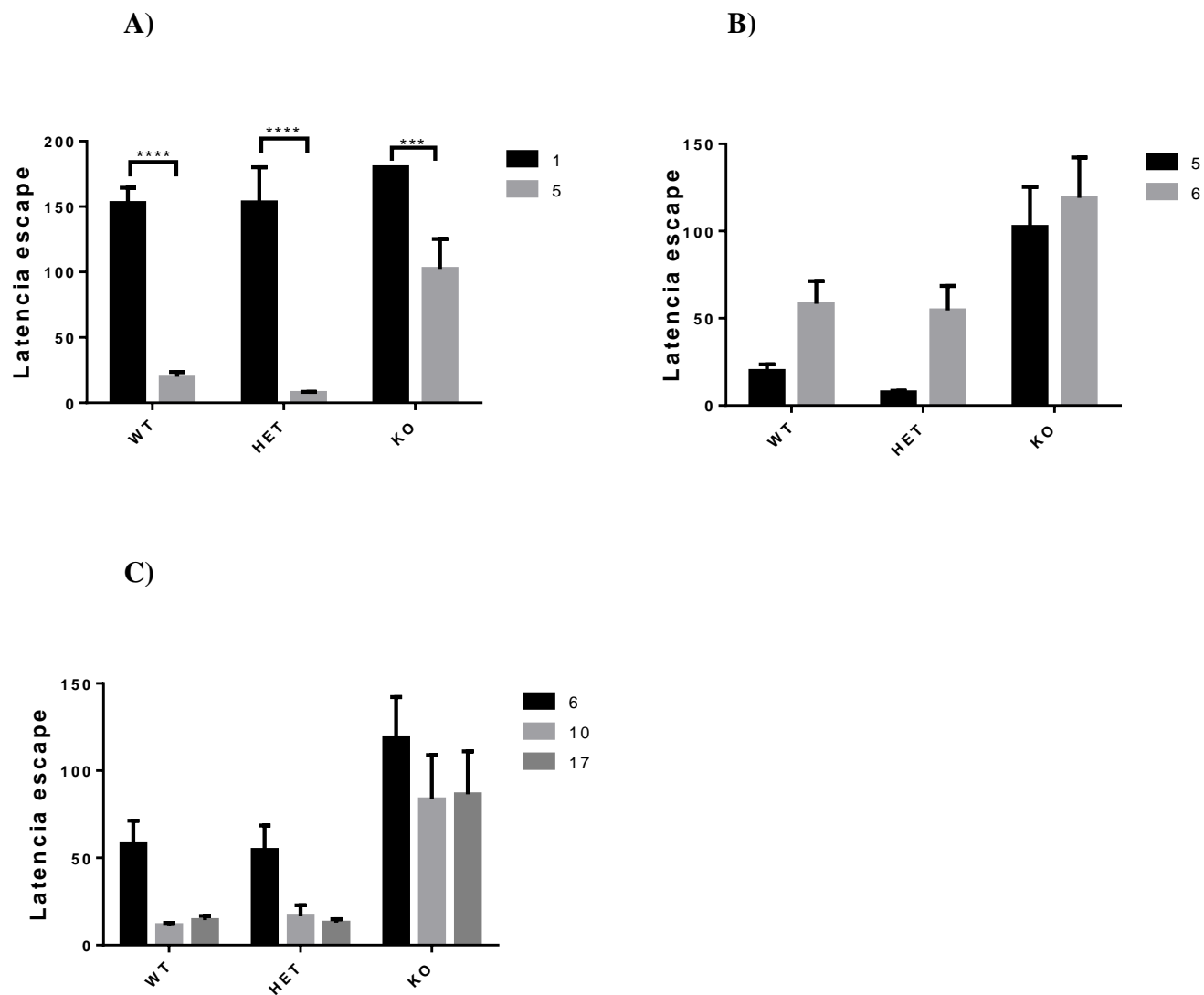


Fig. 15. Latencia escape. A) primer día de adquisición v/s día de prueba. B) Día de prueba v/s primer día reversión. (c) primer día de prueba etapa reversión v/s MLP día 10 y 17. Los datos están representados como media  $\pm$  SEM Two-way ANOVA  $F_{(1,43)}$  gráfico A y B;  $F_{(2,61)}$  gráfico C, seguido de test Sidak's post-hoc test. (\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ). (WT: n=10; HET: n=6 y KO: n=9).

Los tiempos empleados en la latencia de escape disminuyen al comparar los triales 1 y 4 en todos los grupos (Figura 16 a, b y c). En el grupo WT se observa una interacción muy significativa entre los triales (Two-way ANOVA  $F_{(1,137)}$ ,  $P < 0.0001$ ). En el análisis de comparación múltiple, se observan diferencias significativas en el día 1 y 2 ( $P < 0,0001$  test Sidak's) y significativa en el día 3 y 6 ( $P < 0.05$  test Sidak's; Figura 16a). En el grupo HET se observa una interacción significativa entre los triales (Two-way ANOVA  $F_{(1,80)}$ ,  $P = 0.0258$ ). En el análisis de comparación múltiple se observa una diferencia muy significativa solo en el día 1 ( $P < 0,001$  test Sidak's; Figura 16b). Finalmente en el grupo KO se observa una interacción muy significativa entre los triales (Two-way ANOVA  $F_{(1,127)}$ ,  $P = 0.0005$ ). Sin embargo, el análisis de comparación múltiple no muestra diferencias significativas en los distintos días ( $P > 0,05$  test Sidak's; Figura 16c). Esto sugiere que no existiría un aprendizaje a corto plazo en este genotipo. Como lo esperábamos existe una tendencia a un mejor desempeño del grupo WT en esta prueba ya que aprenden más rápido que sus pares.

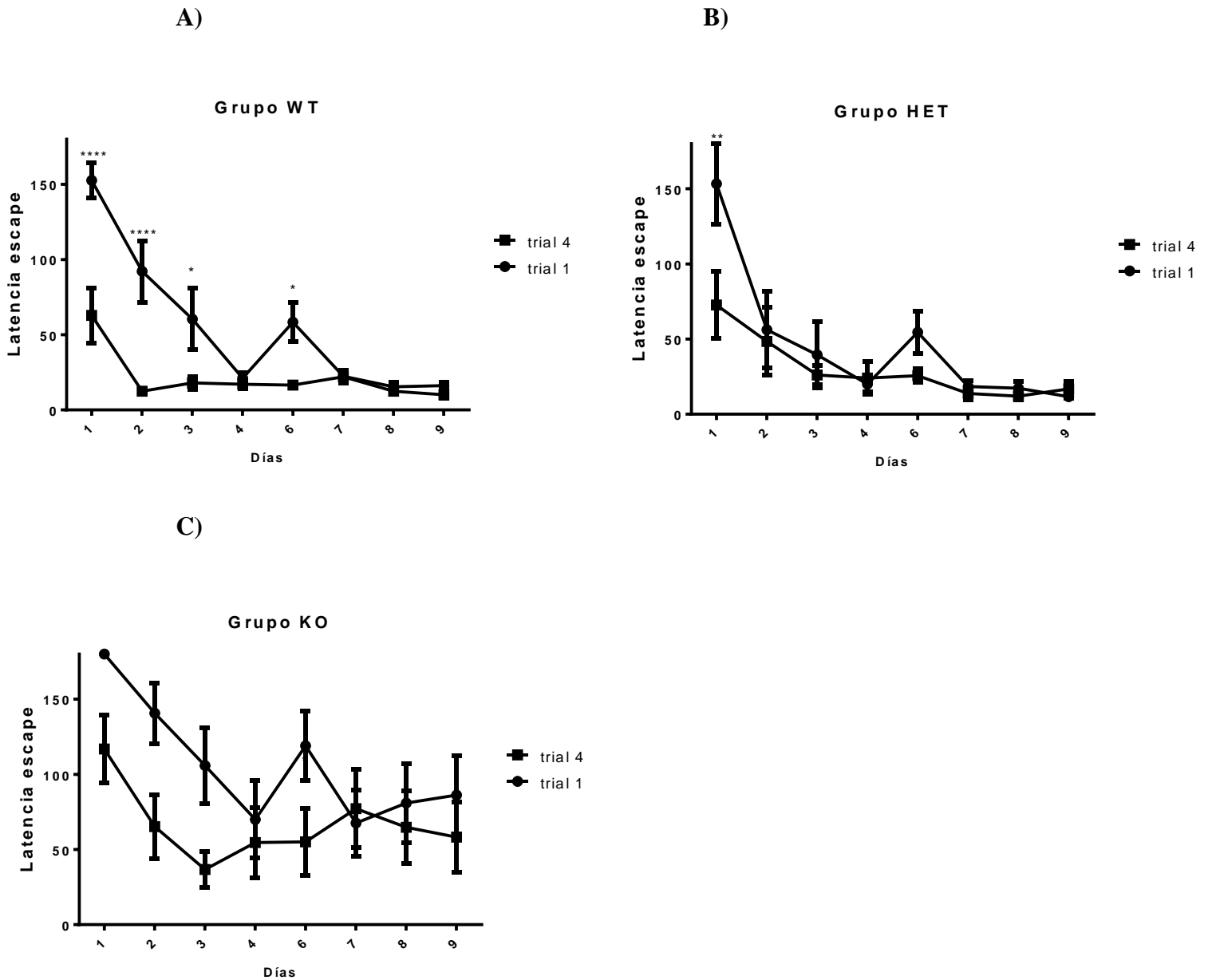


Figura 16. Latencia escape triales 1 y 4. A) Grupo WT. B) grupo HET. C) Grupo KO. Los datos están representados como media  $\pm$  SEM Two-way ANOVA  $F_{(137)}$  gráfico A;  $F_{(1,80)}$  gráfico B y  $F_{(1,127)}$  gráfico C, seguido de test Sidak's post-hoc test. (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ). (WT:  $n=10$ ; HET:  $n=6$  y KO:  $n=9$ ).

### 4.3.3 Errores primarios

Al analizar el número de errores que cometen los animales hasta antes de encontrar el agujero de escape en los cuatro triales durante la etapa de adquisición (día 1 al 5), no se observa una interacción significativa entre los grupos (Two-way ANOVA  $F_{(2,365)}$ ,  $P < 0.8872$ ; Figura 17a). Al graficar el área bajo la curva del aprendizaje (AuC), no se observa una diferencia significativa entre los grupos (One-way ANOVA  $F_{(2,22)}$ ,  $P = 0.3233$ ; Figura 17b). Si bien el grupo KO tuvo un menor desempeño del aprendizaje en comparación con los grupos WT y HET, el análisis de comparación múltiple muestra que no existe una diferencia significativa del aprendizaje (test Tukey's,  $P > 0.05$ ; Figura 17b).

En la segunda etapa del aprendizaje; etapa de reversión (día 6 al 17), no se observa una interacción significativa entre los grupos (Two-way ANOVA  $F_{(2,381)}$ ,  $P < 0.4141$ ; Figura 17c). Al graficar el área bajo la curva del aprendizaje (AuC), no se observa una diferencia significativa entre los grupos (One-way ANOVA  $F_{(2,22)}$ ,  $P = 0.7425$ ; Figura 17d). Si bien el grupo KO y HET tuvo un mejor desempeño del aprendizaje en comparación con los grupos WT, el análisis de comparación múltiple muestra que no existe una diferencia significativa del aprendizaje (test Tukey's,  $P > 0.05$ ; Figura 17d). Estos datos nos sugieren que no existe una diferencia en el aprendizaje a largo entre los distintos grupos.

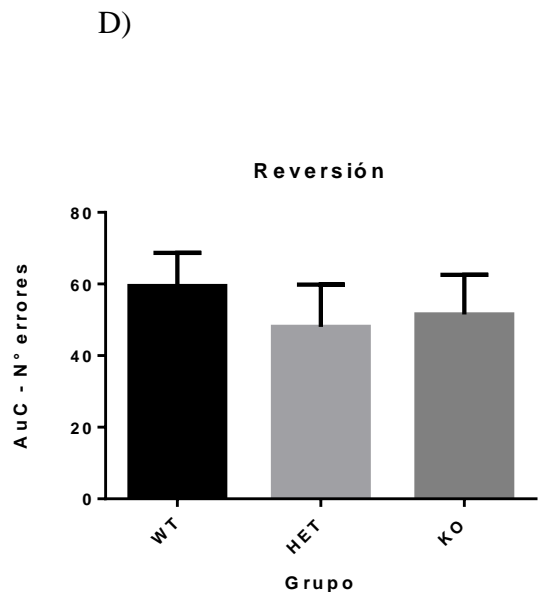
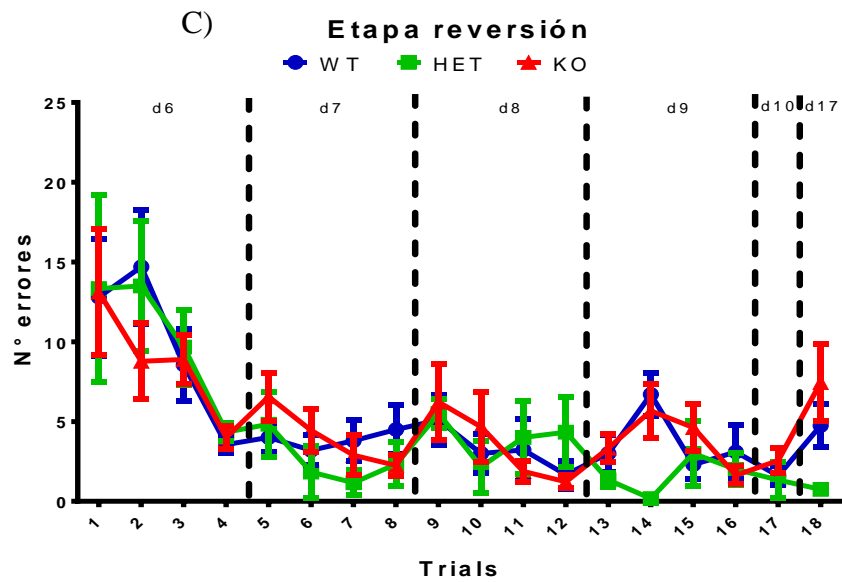
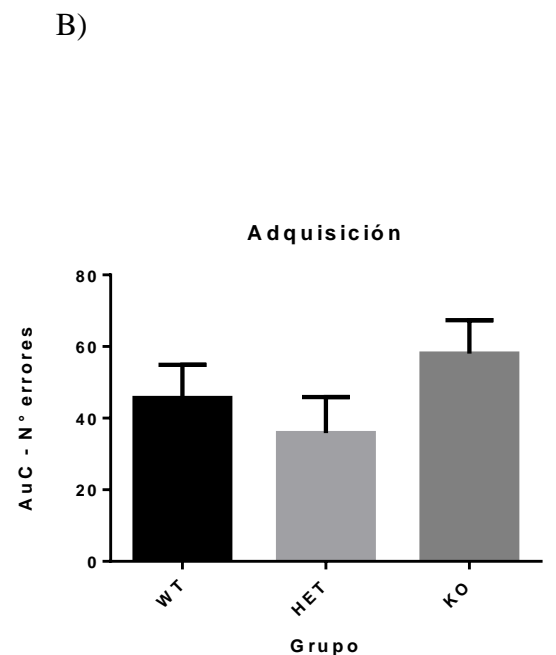
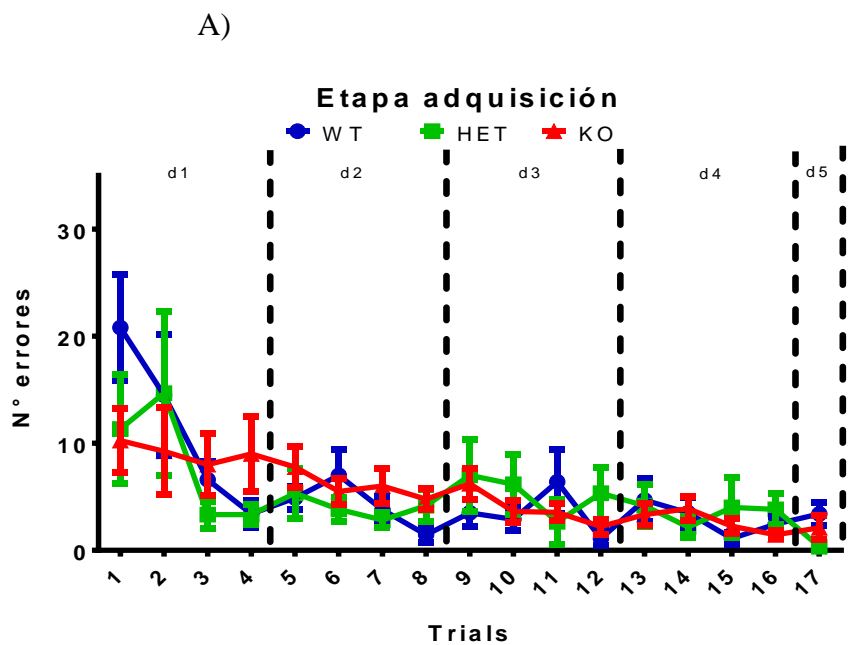


Figura 17. Errores primarios. A) Curva aprendizaje etapa adquisición. B) Área bajo la curva aprendizaje (AuC) etapa adquisición. C) Curva aprendizaje etapa reversión. D) Área bajo la curva aprendizaje (AuC) etapa de reversión. Los datos están representados como media  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA  $F_{(2,365)}$  gráfico A;  $F_{(2,22)}$  gráfico B;  $F_{(2,381)}$  gráfico C;  $F_{(2,22)}$  gráfico D, seguido de Tukey's post-hoc test. (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ); (WT:  $n=10$ ; HET:  $n=6$  y KO:  $n=9$ ).

Al graficar la cantidad de errores que los animales cometen hasta antes de encontrar el agujero de escape, solo se observan diferencias significativas el primer día en el trial uno y cuatro (Anexo Figura 8 a y d). Se observa que durante la etapa de adquisición (días 1 al 4), hay una disminución en la cantidad de errores a medida que pasan los días incluyendo el día 5 en el trial 1 para todos los grupos. Por otro lado, apreciamos un aumento en el número de errores en el día 6 (reversión) al compararlo con el día de prueba o el último día de adquisición (día 4), consistente con el aprendizaje de una nueva ubicación del agujero de escape. Al igual que en la etapa de adquisición, observamos en la fase de reversión (días 6 al 9) una disminución en los errores a medida que pasan los días. También se observa una disminución general de los errores a medida que aumentan los trials en los días (Anexo figura 8).

Específicamente en el trial 1 no se observa una interacción significativa entre los grupos (Two-way ANOVA  $F_{(2,224)}$ ,  $P = 0.4404$ ). En el análisis de comparación múltiple solo se observó una diferencia significativa en el día 1 entre el grupo WT y KO (test Tukey,  $P < 0.01$ ) y entre el grupo WT y HET (test Tukey,  $P < 0.05$ ; Anexo Figura 8a).

En el trial 2 no se observa una interacción significativa entre los grupos (Two-way ANOVA  $F_{(2,172)}$ ,  $P = 0.5109$ ). En el análisis de comparación múltiple no se observan diferencias significativas (test Tukey  $> 0.05$ ; Anexo Figura 8b).

En el trial 3 no se observa una interacción significativa entre los grupos (Two-way ANOVA  $F_{(2,171)}$ ,  $P = 0.6113$ ). En el análisis de comparación múltiple no se observan diferencias significativas (test Tukey  $> 0.05$ ; Anexo Figura 8c).

Finalmente en el trial 4 no se observa una interacción significativa entre los grupos (Two-way ANOVA  $F_{(2,169)}$ ,  $P = 0.2939$ ). En el análisis de comparación múltiple se observó una diferencia significativa en el día 1 entre los grupos WT/KO (test Tukey,  $P < 0.01$ ) y HET/KO (test Tukey,  $P < 0.05$ ; Anexo Figura 8d). A diferencia de lo que esperábamos, estos últimos resultados nos sugieren que no hay un peor desempeño del aprendizaje del grupo KO y que las mayores diferencias sólo están presentes en el primer día de la prueba.

Al comparar el primer día de adquisición con el día de prueba (día 5), se observa que el número de errores disminuye en todos los grupos (Figura 18a). Se observa un factor muy significativo en los grupos (Two-way ANOVA  $F_{(1,43)}$ ,  $P < 0.0001$ ). El análisis de comparación múltiple arroja una diferencia muy significativa en el grupo WT (test Sidak's,  $P < 0.001$ ). Esto confirmaría la existencia de un aprendizaje a largo plazo en todos los grupos, siendo mayor en el grupo WT.

Al comparar el día de prueba con el primer día de reversión se observa un aumento de tiempo en los tres grupos (Figura 18b). Se observa un factor muy significativo entre los grupos (Two-way ANOVA  $F_{(1,43)}$ ,  $P < 0.0001$ ). El análisis de comparación múltiple arroja una diferencia significativa en los grupos HET y KO (test Sidak's,  $P < 0.05$ ), no así para el grupo WT.

Finalmente al comparar el primer día de reversión (día 6), con la prueba de reversión a largo plazo (día 10 y 17), se aprecia una disminución en los errores en todos los grupos (Figura 18c). Se observa un factor muy significativo entre los grupos (ANOVA  $F_{(2,61)}$ ,  $P < 0.0001$ ). El análisis de comparación múltiple entre los días 6 y 10 arroja diferencias muy significativas en el grupo WT (test Tukey's,  $P < 0.01$ ) y significativas en el grupo HET y KO (test Tukey's,  $P < 0.05$ ). En el caso de los días 6 y 17 se ve una diferencia significativa solo en el grupo HET (test Tukey's,  $P < 0.05$ ). Estos resultados confirmarían que en el aprendizaje de reversión a largo plazo no hay diferencias entre los grupos al comparar los días 6 y 10, sin embargo el grupo HET logró cometer menos errores que los demás grupos al comparar los días 6 y 17.

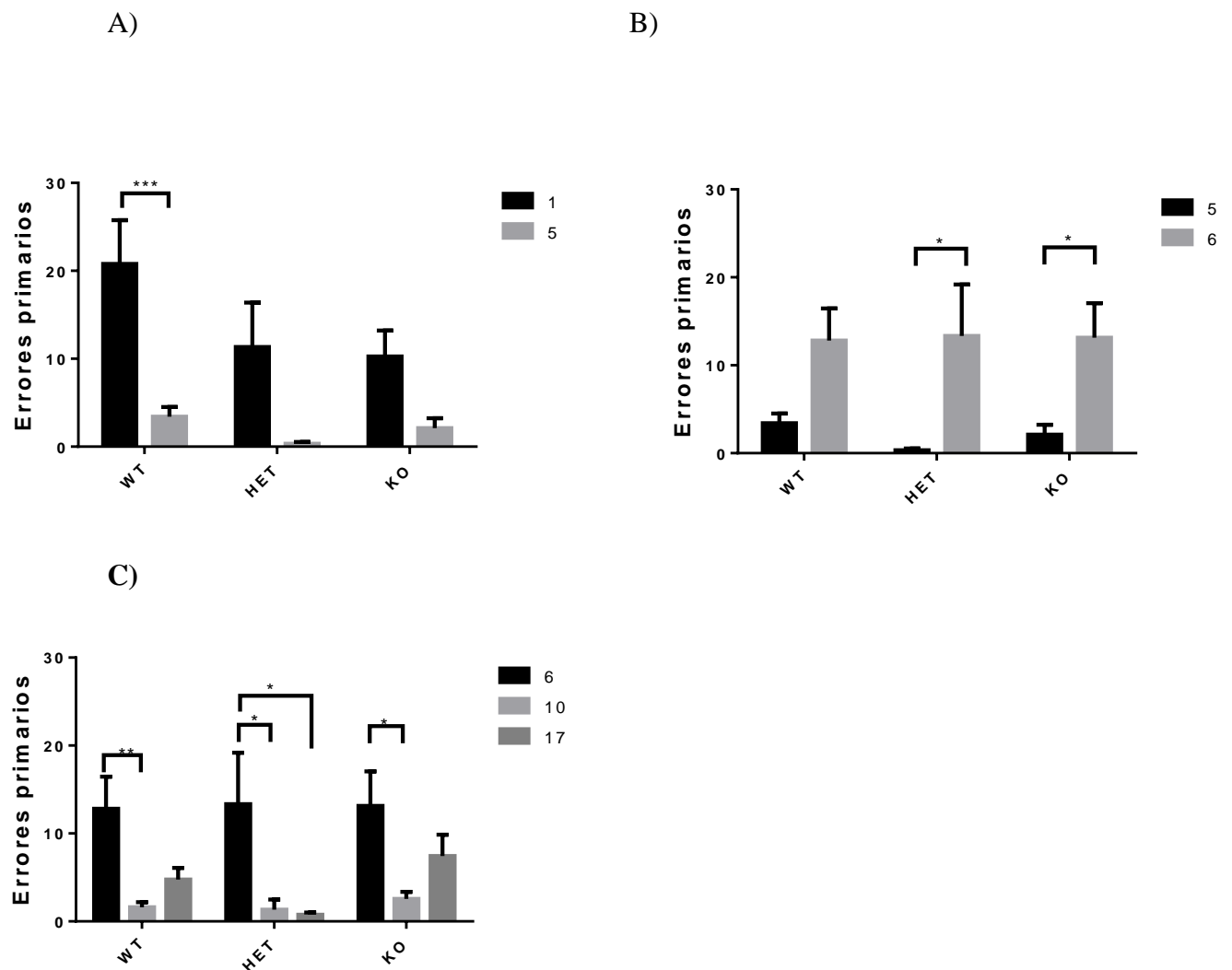


Figura 18. Errores primarios. A) primer día de adquisición v/s día de prueba. B) Día de prueba v/s primer día reversión. c) primer día de prueba etapa reversión v/s MLP día 10 y 17. Los datos están representados como media  $\pm$  SEM Two-way ANOVA  $F_{(1,43)}$  gráfico A y B; y  $F_{(2,61)}$  gráfico C, seguido de test Sidak's C post-hoc test gráfico A y B y Tukey's gráfico C post-hoc test. ( $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ ). (WT: n=10; HET: n=6 y KO: n=9).

La cantidad de errores primarios disminuyen al comparar los triales 1 y 4 en todos los grupos (Figura 19 a, b y c). En el grupo WT se observa una interacción muy significativa entre los triales (Two-way ANOVA  $F_{(1,136)}$ ,  $P < 0.0001$ ). En el análisis de comparación múltiple, se observan diferencias muy significativas en el día 1 ( $P < 0.0001$ ) y 6 ( $P < 0,05$  test Sidak's; Figura 19a). En el grupo HET se observa un factor significativo entre los triales (Two-way ANOVA  $F_{(1,80)}$ ,  $P = 0.0263$ ). En el análisis de comparación múltiple no se observan diferencias significativas entre los grupos ( $P > 0,05$  test Sidak's; Figura 19b). Finalmente en el grupo KO se observa un factor muy significativo entre los triales (Two-way ANOVA  $F_{(1,124)}$ ,  $P < 0.0001$ ). El análisis de comparación múltiple se observa una diferencia muy significativa en el día 6 ( $P < 0,01$  test Sidak's; Figura 19c). Al igual que en el parámetro de latencia primaria, estos resultados sugieren un aprendizaje a corto plazo en todos los grupos y vemos un mejor desempeño a medida que avanzan los días en las etapas de adquisición y reversión.

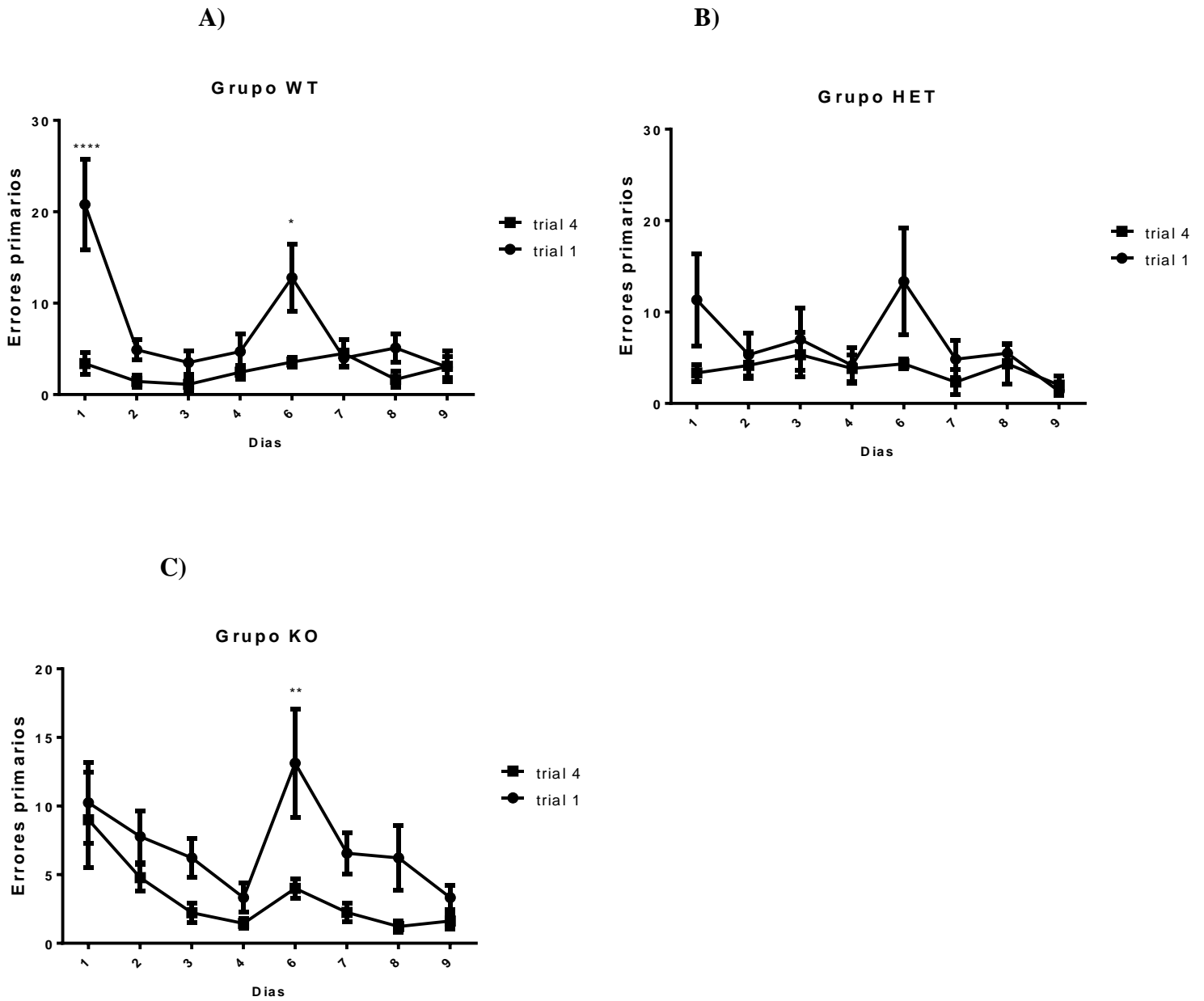


Figura 19. Errores primarios 1 y 4. A) Grupo KO. B) grupo HET. C) Grupo WT. Los datos están representados como media  $\pm$  SEM Two-way ANOVA  $F_{(1,137)}$  gráfico A;  $F_{(1,80)}$  gráfico B y  $F_{(1,124)}$  gráfico C, seguido de test Sidak's post-hoc test. (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ). (WT: n=10, HET: n=6 y KO: n=9).

## **5. DISCUSIÓN**

### **5.1 Tarea campo Abierto (Open field)**

La disminución de la actividad locomotora en los ratones SERT KO se ha descrito en varios trabajos. Un estudio reportó que la actividad motora disminuye en ratones KO hembra (Kallueff et al., 2006). Otro estudio mostró que animales con mayores niveles de ansiedad en ambientes nuevos, manifiestan una reducción en la locomoción exploratoria (Holmes et al., 2001). Finalmente ratones SERT KO mostraron significativamente menos actividad exploratoria en comparación a ratones WT en un campo abierto iluminado (Holmes et al., 2001). Al igual que en estos trabajos, en la presente tesis observamos el efecto del genotipo sobre la distancia recorrida a través de los grupos experimentales. El análisis de comparación múltiple nos indica que el grupo KO recorrió una distancia significativamente menor al grupo WT (Figura 8). Estos resultados confirman que la actividad locomotora en ratones machos deficientes de SERT está disminuida. Por otro lado, el tiempo y frecuencia que los ratones pasan en el centro está relacionado con el nivel de ansiedad de los animales. En la prueba de laberinto en cruz hay una tendencia de aumento en la ansiedad, ya que los ratones adultos pasan menos cantidad de tiempo en los brazos abiertos que sus pares homólogos jóvenes (Sakabibara et al., 2014). Lo mismo sucede en el campo abierto donde ratones adultos pasan menos tiempo en la zona central en tareas de aprendizaje (Sakabibara et al., 2014). El campo abierto existen dos áreas; una central que es desprotegida y el animal está expuesto y un área protegida (las periferia) en donde se siente más seguro. Por lo tanto los ratones SERT KO al ser más ansiosos evitan estar expuestos en ambientes desprotegidos (centro) y por lo tanto pasarán más tiempo en

las áreas periféricas. Del mismo modo, ratones tratados con corticoides desarrollan un fenotipo similar a la ansiedad en el ensayo de campo abierto, disminuyendo el tiempo que pasan en el centro de la arena (Darcet et al., 2014). Tal como se describen en estos trabajos, el tiempo de permanencia de los animales en el centro de la arena disminuye en el grupo KO en comparación a los grupos HET y WT. Sin embargo, el análisis de comparación múltiple nos muestra que esta diferencia no fue significativa entre los distintos grupos (Figura 9). No obstante, estos resultados sugieren que en nuestras condiciones la ausencia total de SERT induce conductas tipo-ansiosas. Estos resultados se debieron quizás a que en nuestro protocolo utilizamos luz roja con una intensidad muy baja la cual quizás favoreció la no adversidad de la plataforma expuesta. Revisando algunos trabajos vemos que se describe en los protocolos de Oliver 2009, quien describe el uso de luz blanca tenue y el los protocolos de Vongel-Ciernia, et al. 2014, que sugieren el uso de luz blanca con intensidades en el campo abierto entre 45 a 48 lux.

## 5.2 Tarea de reconocimiento de objetos (NOR)

Hay un solo estudio de NOR realizado en ratones SERT hembras adultos (Kalueff et al., 2007). Estos autores encontraron diferencias significativas entre los genotipos y un aumento de la neofobia (menor número de enfoques) en los ratones SERT KO en comparación con los ratones WT en la prueba NOR durante 3 minutos. Considerando que SERT KO es un ratón susceptible a estrés y dado la ausencia de tiempo en habituación, los efectos observados en el grupo KO podrían ser consecuencia en parte a una condición de estrés asociado a la exposición de los objetos. Además, quisimos complementar este trabajo evaluando también la memoria de reconocimiento de lugar (MRL). Nuestros resultados en la primera etapa de la prueba, etapa de familiarización, muestran una tendencia a la menor exploración de objetos en el grupo KO en comparación a los grupos HET y WT durante los tres trials (Fig. 10a). No obstante, el análisis de comparación múltiple nos muestra una diferencia significativa en el trial 3 entre el grupo KO y HET, la cual no fue significativa con respecto al grupo WT. Cabe mencionar que los tiempos de exploración para todos los grupos fueron bajos en comparación a lo reportado por otros autores (Uekita et al., 2011; Arias- Cavieres et al., 2017). Observamos que hay una tendencia a una menor exploración del objeto B en todos los grupos, sin embargo estas no son diferencias significativas (Anexo Figura 3). Contrario a lo esperado, en la segunda etapa de prueba, el caso de la MRL, se observó una tendencia a una menor exploración de los objetos movidos en comparación a los objetos no movidos para todos los grupos experimentales (Figura 10b). Los objetos movidos fueron el B/C y los familiares (no movidos), el A/D (Figura 6 Metodología). Sin embargo, no observamos una discriminación entre objetos movidos

versus no movidos (Figura 10b). Interesantemente, al igual que en la etapa de familiarización, observamos que el grupo KO presentó la menor exploración de objetos comparado a los otros grupos. Esto está en concordancia con la neofobia descrita para este modelo animal por Kalueff y cols (2006). Sin embargo, al comparar la exploración de los objetos movidos y no movidos en los distintos grupos no observamos una discriminación entre ellos (Figura 10b). Esto indicaría que ningún grupo presenta una tendencia a la exploración. Cabe destacar que en todos los grupos el mayor tiempo de exploración se realizó en el objeto A (Anexo Figura 2). Por otro lado, al comparar la exploración por grupo observamos que existe una diferencia significativa en el grupo HET, entre el objeto familiar A y el objeto movido B (Anexo Figura 4).

Por último, con respecto a la MRO, se observó una menor exploración del objeto cambiado en comparación a los objetos no cambiados para los grupos KO y HET (Figura 10c), no así en el grupo WT. El objeto cambiado en este caso fue el A por el E (Figura 6 Metodología). Este resultado concuerda con los obtenidos para este aprendizaje en los trabajos de Kalueff et al., 2007 y Oliver et al., 2008), sin embargo el análisis de comparación múltiple nos muestra que la diferencia no fue significativa (Figura 10c). Al comparar la exploración del objeto cambiado en los distintos grupos no observamos una discriminación entre ellos, sin embargo si la observamos en los objetos no cambiados entre los grupos HET y KO (Figura 10c). Esto indicaría que solo el grupo HET presenta una mayor tendencia a la exploración para los objetos no cambiados. Cabe mencionar que no existe una tendencia a la exploración por algún objeto en particular (Anexo Figura 3). Y al comparar la exploración

por grupo observamos que no existe una diferencia significativa entre ellos (Anexo Figura 5).

En resumen, estos resultados indicarían que todos los grupos presentarían dificultades en el reconocimiento de tipo espacial, esto quizás debido a que esta prueba presenta una mayor carga cognitiva con respecto al reconocimiento de objetos (Uekita y Okanoya, 2011). Cabe destacar, que en el caso de MRO, el grupo WT muestra una tendencia a explorar más el objeto nuevo, sin embargo, tanto el grupo HET como KO muestran la tendencia contraria, esto es, presentan una mayor preferencia por el objeto familiar (Figura 10c).

Por lo tanto, se concluye que el protocolo de NOR utilizado en esta tesis, consistente en el incremento a 4 objetos en la arena experimental, no es útil para evaluar aspectos cognitivos en este modelo deficiente de SERT, al menos en las condiciones experimentales utilizadas en este estudio.

### **5.3 Laberinto de Barnes**

La memoria de referencia espacial, ha sido evaluada usando un paradigma clásico que aprovecha la preferencia natural de los roedores para evitar superficies abiertas y muy iluminadas en la prueba de Barnes Maze. Esta prueba tiene la ventaja de no necesitar de estímulos aversivos adicionales que podrían causar estrés o desesperanza en los animales (Schulz et al, 2007). Un estudio realizado en memoria espacial, indica que el desempeño de ratones SERT KO es menor en la latencia para encontrar la plataforma de escape en comparación con los SERT HET y ratones WT, en la prueba espacial de water maze (MWM) (Karaberg et al., 2013). Esto indicaría que el genotipo SERT KO presentaría una dificultad en la memoria tipo espacial para esta prueba. Estos mismos autores realizaron la prueba de BM, no observando diferencias entre los grupos, sin embargo en la prueba, utilizaron poca intensidad lumínica como refuerzo, lo que pudo ocasionar la no aversión por este tipo de estímulo. Considerando estos antecedentes, nosotros aumentamos la intensidad lumínica de 200 a 600 lx para asegurarnos que este estímulo sea lo suficientemente aversivo. Además de aumentar el número a cuatro trials para así reforzar el aprendizaje de tipo espacial (Sunyer et al., 2007). Adicionalmente, otro grupo de trabajo realizó pruebas en MWM y BM, las cuales sugieren un deterioro del aprendizaje espacial en ratones tratados con corticoides. Además, el uso de corticoides desarrolló un fenotipo similar a la ansiedad y tipo depresivo lo cual se vio reflejado en la disminución del tiempo en el centro en la prueba de campo abierto (Darcet et al., 2014). En estas pruebas también se puede evaluar la flexibilidad cognitiva utilizando el paradigma de aprendizaje por reversión (Izquierdo et al., 2016), aunque en el caso de Karaberg y colaboradores no

midieron flexibilidad cognitiva. Finalmente, existe un solo trabajo que miden flexibilidad cognitiva en ratones SERT, pero que utilizan otro paradigma de aprendizaje que no es igual al BM, pero se acercaría al aprendizaje que deseamos estudiar (el aprendizaje instrumental por discriminación visual), (Brigman et al., 2010). En estos resultados observaron mejoras en la flexibilidad cognitiva del ratón SERT KO respecto a animales controles. Finalmente, a diferencia de los estudios previos, usamos el cuadrante opuesto para evaluar la memoria de reversión, y así asegurarnos de que el cambio de posición sea el más evidente que elegir una posición en el laberinto al azar. También utilizamos en las evaluaciones del aprendizaje (día 5, 10 y 17) un solo trial y no 4 como el resto de los días para ver el aprendizaje en ausencia de refuerzos y compararlos con el día siguiente de reversión, donde nuevamente se someten a una fase de aprendizaje con refuerzo para así asegurar que ocurra el aprendizaje.

En cuanto a la robustez de nuestros resultados, observamos que, a diferencia de lo reportado por Karaberg et al., 2007, si existen diferencias entre los grupos. En general observamos que en dos de los tres parámetros evaluados, durante la etapa de adquisición, hubo un mejor rendimiento de los grupos WT, HET en comparación al KO (Figura 11b y 14b). Cabe destacar que el grupo HET tuvo el mejor rendimiento en los tres parámetros (Figura 11b, 14b y 17b). En el caso de la etapa de reversión, y a diferencia de lo reportado por Brigman et al., 2010, se observó un mejor rendimiento del grupo HET en los tres parámetros (Figura 11d, 14d y 17d). Obtuvimos diferencias significativas en la latencia primaria entre los grupos WT/HET y HET/KO (Figura 11d) y una diferencia muy significativa en la latencia de escape entre los grupos WT/KO y HET/KO (Figura 14d). En el caso del grupo KO observamos una tendencia a un mejor rendimiento en el aprendizaje

de reversión en los parámetros de latencia y errores primarios, no así en la latencia de escape, resultados que se acercan a lo reportado por Brigman et al., 2010. Los análisis específicos en los tres parámetros son los siguientes:

### 5.3.1 Latencia primaria

En este parámetro, y a diferencia de lo reportado por Karaberg et al., 2007, observamos que en la etapa de adquisición (días 1 al 4) hubo un mejor rendimiento de los grupos WT y HET, observándose diferencias significativas entre los genotipos HET y KO (Figura 11b). El mayor rendimiento del grupo WT era el esperado, ya que la pérdida completa de la expresión de SERT conduce a un 60-80% de disminución en 5-HT en estas regiones del cerebro (Bengel et al., 1998). También sabemos que 5-HT sirve como un factor neurotrófico durante el desarrollo temprano (Buznikov et al., 2001), por lo tanto, la interrupción de la función SERT produce un aumento de las concentraciones extracelulares de 5-HT y podría afectar el desarrollo de numerosos sistemas, lo que resulta en cambios adaptativos en el sistema serotoninérgico. Como estas regiones son importantes en la memoria y el aprendizaje, estas estarían afectando el rendimiento en los genotipos SERT KO durante la prueba. Sin embargo el mejor rendimiento del grupo HET no fue el esperado debido a que la inactivación de una copia del gen SERT (HET), no tiene efecto sobre el contenido total de 5-HT en el tejido en la corteza frontal, el hipocampo, el cuerpo estriado, el tronco encefálico y el hipotálamo (Bengel et al., 1998). Por lo tanto se esperaba un rendimiento similar al grupo WT. Estos resultados quizás se deban a la diferencia en el número de animales, en el cual el genotipo HET sólo tenía un n=6 en comparación a los genotipos n=9 KO y n=10 WT.

En el caso de la etapa de reversión (días 6 al 9), observamos un mejor rendimiento del grupo HET (Figura 11c y d) y diferencias significativas entre los grupos WT/HET y HET/KO), (Figura 11d). Además, tanto en la etapa de adquisición como la etapa de

reversión, observamos una disminución en los tiempos de reconocimiento del agujero de escape a medida que pasan los días en todos los triales (Anexo Figura 6a, b, c y d). Esto se confirma al comparar el primer día de adquisición con el día de prueba (día 5), donde se observa que los tiempos para encontrar el agujero de escape disminuyen en todos los grupos obteniéndose diferencias significativas en el genotipo WT y muy significativa en el grupo KO (Figura 12a). No obstante aunque esta no fue significativa en el grupo HET, observamos un mejor rendimiento ya que los tiempos son menores al compararlo con los demás grupos al aprender la ubicación del escape. Al comparar el primer día de reversión (día 6), con la prueba de reversión a largo plazo (día 10), se aprecia una disminución en los tiempos en todos los grupos, obteniendo diferencias significativas en el grupo HET y muy significativas en los grupos WT y KO (Figura 12c). Por otro lado al comparar el día de prueba con la reversión al día 17, se ven diferencias significativas en el grupo WT y muy significativa en el grupo KO, no así en el grupo HET. (Figura 12c). Estos primeros resultados indicarían que existe un aprendizaje tipo espacial y una memoria a largo plazo en la etapa de adquisición que se vería influenciada por el genotipo SERT, donde este presentaría un menor desempeño que los genotipos HET y WT. En el caso de la etapa de reversión, también existiría aprendizaje a largo plazo, pero a diferencia de lo esperado, observamos un menor desempeño de los genotipos KO/WT en comparación al grupo HET. Sin embargo al comparar el desempeño del grupo KO con el WT observamos que este fue similar lo que nos sugiere que la flexibilidad no se ve afectada en este parámetro. Estos resultados son similares a los obtenidos por Homberg et al., 2007c, que concluyen que el comportamiento de la flexibilidad no se ve afectada en ratas SERT. La corteza orbitofrontal (COF) es importante para el aprendizaje de reversión y se ha demostrado que

esta estructura se correlacionan con deficiencias en este tipo de aprendizaje. (Boulougouris et al., 2007). Es posible que por los cambios en los niveles intra y extracelulares de 5-HT y modificaciones en sus receptores contribuyan a facilitar el aprendizaje de reversión. Se esperaba que el aumento de los niveles extracelulares de 5-HT en la COF en ratas SERT KO, se correlacionaran con una mejora en el aprendizaje de reversión, sin embargo no se observaron diferencias de genotipo (Homborg et al., 2007c). Por otro lado, al comparar el aprendizaje en la etapa de adquisición entre grupos para cada trial, esperábamos obtener un mayor tiempo en los grupos KO y HET durante toda la prueba, sin embargo, solo observamos diferencias significativas en los 2 primeros días en este parámetro evaluado (Anexo Figura 6 a, c y d). Estos resultados nos indicarían que son en estos días donde existen las mayores diferencias en los aprendizajes del genotipo SERT. También se observa una disminución general de los tiempos a medida que aumentan los triales en los días (Anexo Figura 6a, b, c y d), esto indicaría que existe una memoria a corto plazo que está presente indiferente al genotipo de SERT. Para confirmar estos resultados comparamos el rendimiento del trial uno con el trial cuatro durante las pruebas, donde se esperaba un mejor rendimiento en el grupo WT en comparación a los grupos HET y KO. En todos los grupos se observó una interacción muy significativa entre los triales (Figura 13 a, b y c). Era esperable que las mayores diferencias las observamos el primer día en las fases de adquisición y reversión del aprendizaje debido a que es la primera intervención para ubicar el agujero de escape en un lugar determinado. Tal como se esperaba, el grupo WT obtuvo mejor rendimiento que los grupos HET y KO debido a que le toma menos tiempo y menos triales que el resto de los grupos para aprender la ubicación del escape (Figura 13a).

### 5.3.2 Latencia de escape

En cuanto al parámetro de latencia de escape, el cuál no estaba reportada en otros trabajos similares, se observa una gran diferencia en el grupo KO, el cual le tomó más tiempo para completar la prueba (Figura 14a y c; fig. 16a, b, c y d). Observamos diferencias muy significativas entre los grupos WT/KO y HET/KO, tanto en la etapa de adquisición como de reversión (Figura 14b y d). Se observa que durante la etapa de adquisición y la reversión, hay una disminución en los tiempos de escape en los grupos HET y WT, pero en el caso del grupo KO, esta disminución no fue constante y en algunos días fue aumentando, confirmando su dificultad para esta prueba (Figura 14 a y c; Anexo Figura 7 a, b, c y d). Esto indicaría que para este parámetro, existe una dificultad en el escape para el grupo KO teniendo un menor desempeño del aprendizaje a largo plazo, en comparación a los grupos HET y WT. Al comparar el primer día de adquisición con el día de prueba (día 5), se observan diferencias muy significativas en todos los grupos, pero con una menor diferencia en los tiempos en el grupo KO, confirmando un menor aprendizaje para el genotipo SERT (Figura 15a). En el caso del aprendizaje de reversión hay una tendencia a un peor desempeño del grupo KO, donde se observan una menor diferencia entre el primer día de reversión (día 6) con los días de prueba (10 y 17), además de ejecutar la prueba en un mayor tiempo que los demás grupos (Figura 15c). Confirmando nuevamente su dificultad en comparación a los demás grupos para este parámetro. Por otro lado, las diferencias significativas observadas en los distintos trials, nos indican que las mayores diferencias en los aprendizajes en el genotipo SERT, estarían presentes en la mayoría de los días durante la etapa de adquisición, reversión y pruebas respectivamente (Anexo Figura 7 a, b c y d).

También se observa una disminución general de los tiempos a medida que aumentan los trials en los días en los grupos HET y WT, pero en el caso del grupo KO esta fue menor al compararla con los demás grupos (Anexo Figura 7a, b, c y d). Esto indicaría que existe una memoria a corto plazo que se vería afectada por el genotipo de SERT, no así para los grupos WT y HET. Estos resultados se confirman al comparar los trials 1 y 4, donde no se observan diferencias significativas en los distintos días, además de no disminuir en forma constante los tiempos de los trials (Figura 16c). Cabe destacar que el grupo HET obtuvo el mejor rendimiento debido a que le toma menos tiempo y menos trials que el resto de los grupos para aprender la ubicación del escape (Figura 16b). En el caso del grupo KO se observan dificultades en la reversión del aprendizaje, debido a que la curva del tiempo no disminuye significativamente (Figura 16c). Por último, tal como esperaríamos todos los grupos disminuyeron su tiempo al trial 4, no obstante el grupo KO aun demora más tiempo en encontrar la plataforma de escape que los otros grupos. (Figura 16c). Cabe destacar que esta prueba requiere que el animal pase de la plataforma a una caja de escape ubicada por debajo del agujero de escape. Para ello el animal debe realizar varios movimientos que involucran partes como la cola y las extremidades. Notamos que durante las pruebas el genotipo KO tenía dificultades para realizar estos movimientos al momento de salir de la plataforma, pese a que se le facilitó este escape agregando un plano inclinado en la caja. Esto es congruente con lo reportado por Kallueff et al., 2007 que reportó que la actividad motora disminuye en ratones KO hembra y Holmes y Wellman, 2009 que mostró que animales con mayores niveles de ansiedad en ambientes nuevos, manifiestan una reducción en la locomoción exploratoria. Otro factor que quizás esté involucrado es el temor o estrés que pudiesen sentir los animales al ingresar a la caja producto del genotipo reportado.

### 5.3.3 Errores primarios

En cuanto al último parámetro evaluado, observamos que si bien hay una tendencia a un mejor desempeño del grupo HET y un menor desempeño en el genotipo KO, en la etapa de adquisición, no hay diferencias significativas entre los grupos (Figura 17b). Lo mismo se observa en la etapa de reversión donde todos los grupos presentan un número similar de errores primarios y una tendencia a un mejor desempeño del grupo HET (Figura 17d). También se observa una disminución en todos los genotipos, en la cantidad de errores hasta antes de encontrar del agujero de escape a medida que pasan los días en todos los triales. (Anexo Figura 8a, b, c y d). Interesantemente, solo se observó una diferencia muy significativa en el grupo WT el cual disminuyó el número de visitas a otros agujeros al quinto día de la prueba (Figura 8a). Sin embargo cabe notar que tanto el grupo KO como HET mostraron un menor número de errores durante el primer día, lo que sugiere una menor exploración. Estos resultados indicarían que para este test existe un aprendizaje de tipo espacial y una memoria a largo plazo en todos los grupos no siendo afectado el genotipo SERT. También se observa una disminución general de los tiempos a medida que aumentan los triales en los días (Anexo figura 8a, b, c y d). Esto indicaría que existe una memoria a corto plazo que está presente indiferente al genotipo de SERT. Al comparar el trial 1 con el 4 en los distintos grupos, se confirmaría que, durante los días de adquisición, todos los grupos presentan una memoria espacial a corto plazo del aprendizaje, no afectando el genotipo SERT para este parámetro (Figura 19a, b y c). Por último las diferencias significativas observadas en los distintos triales, nos indicarían que las mayores diferencias en los aprendizajes del genotipo SERT estarían presentes en el primer día en

éste parámetro evaluado y solo e los triales 1 y 4 (Anexo Figura 8a y d). En el caso de la etapa de reversión al igual que en la etapa de adquisición vemos una disminución en el número de errores en todos los grupos (Anexo Figura 8a, b, c y d). Al comparar el rendimiento del día 6 con el día 10, observamos diferencias significativas en el grupo HET y KO y muy significativas en el grupo WT (Figura 18c). También al comparar el día 6 con el 17 observamos disminución en los errores en todos los grupos, sin embargo solo el grupo HET presento diferencias significativas. Estos resultados indicarían que todos los grupos presentan un aprendizaje de reversión siendo el grupo HET el que presentó un mejor desempeño. En cuanto a la etapa de reversión, todos los grupos presentan una flexibilidad cognitiva a corto plazo, debido a la disminución en el número de errores cometido. Cabe destacar que al grupo KO le toma un poco más de tiempo que el resto de los grupos para aprender la ubicación (mas triales o más días que el resto), (Figura 19c). Esto podría indicar que este genotipo presenta un menor desempeño en la memoria a corto plazo.

Finalmente, si comparamos el rendimiento de la fase de reversión con la fase de adquisición, evidenciamos mejoras en el aprendizaje en todas las mediciones, ya que los animales cometieron menos errores y tardaron menos tiempo en encontrar y escapar del agujero. Este resultado debido posiblemente a los recuerdos y aprendizajes obtenidos en la adquisición que permitió mejorara el aprendizaje en la segunda etapa de reversión.

## 6. CONCLUSIONES

- Confirmamos la disminución de la actividad locomotora en ratones deficientes de SERT.
- En las condiciones de nuestras pruebas, los ratones deficientes de SERT, presentarían una tendencia a evitar las zonas expuestas o desprotegidas, sugiriendo que este genotipo induce conductas tipo ansiosas, esto quizás por la no utilización de luz blanca tenue.
- Con las modificaciones del protocolo en NOR no fue posible medir el aprendizaje debido a que no se cumplió el paradigma. No existiría una tendencia a la exploración en los ratones SERT al cambiar de lugar o al cambiar el tipo de objeto en ningún genotipo.
- En la latencia primaria, el genotipo SERT KO no presentaría dificultades en la etapa de adquisición del aprendizaje a corto y largo plazo. En la etapa de reversión, no observamos diferencias en la flexibilidad cognitiva.
- En la latencia de escape el genotipo SERT KO presentaría dificultades en el aprendizaje a corto y largo plazo, así como también en el aprendizaje de reversión, esto debido quizás a los problemas motrices al momento de escapar en la plataforma, lo que no se ve en los grupos WT y HET.
- En los errores primarios, no hay diferencias del aprendizaje a largo plazo en la etapa de adquisición y reversión del aprendizaje en el genotipo SERT. Todos los grupos

presentan un rendimiento similar en la memoria espacial a corto plazo, pero el grupo KO podría presentar un menor desempeño en este tipo de memoria porque necesitaría más trials y días que los genotipos WT y HET.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Aggleton, J.P; Albasser, M.M; Aggleton, D.J; Poirier, G.L; Pearce, J.M. (2010). Lesions of the rat perirhinal cortex spare the acquisition of a complex configural visual discrimination yet impair object recognition. *Behav Neurosci.* 124: 55–68.

Albasser, M.M; Davies, M; Futter, J.E; Aggleton, J.P. (2009). Magnitude of the object recognition deficit associated with perirhinal cortex damage in rats: effects of varying the lesion extent and the duration of the sample period. *Behav Neurosci.* 123:115–124.

Antunes M, Biala G. (2012).The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process.* 13(2):93-110.

Ardiles, A.O; Tapia-Rojas, C.C; Mandal, M; Alexandre, F; Kirkwood, A; Inestrosa, N.C. (2012). Postsynaptic dysfunction is associated with spatial and object recognition memory loss in a natural model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(34), 13835–13840.

Arias-Cavieres, A; Adasme,T; Sánchez, G; Muñoz, P; Hidalgo, C. (2017). Aging Impairs Hippocampal- Dependent Recognition Memory and LTP and Prevents the Associated RyR Up-regulation. *Front Aging Neurosci.* 9: 111.

Bengel, D; Murphy D.L; Andrews, A.M; Wichems, C.H; Feltner, D; Heils, A; Mössner, R; Westphal, H; Lesch, K,P, (1998). Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3, 4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") in serotonin transporter-deficient mice. *Molecular Pharmacology.* 53(4): 649-655.

Bekinschtein, P; Renner, M. C; Gonzalez, M. C; Weisstaub, N. (2013). Role of medial prefrontal cortex serotonin 2A receptors in the control of retrieval of recognition memory in rats. *J. Neurosci.* 33 (40): 15716-15725.

Berger M; Gray J.A; Roth B.L. (2009). The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med* 60: 355–366.

Bird, C. M. & Burgess, N. (2008). "The hippocampus and memory: insights from spatial processing." *Nat Rev Neurosci* 9(3): 182-194.

Boulougouris, V; Dalley; J. W; Robbins, T. W. (2007). Effects of orbitofrontal, infralimbic, and prelimbic cortical lesions on serial spatial reversal learning in the rat. *Behav. Brain. Res.* 179: 219–28.

Brigman, J.L; Mathur, P; Harvey-White, J; Izquierdo, A; Saksida, L.M; Bussey, T.J; Fox, S; Deneris, E; Murphy, D.L; Holmes, A. (2010), Pharmacological or genetic inactivation of the serotonin transporter improves reversal learning in mice. *Cereb Cortex.* 20(8): 1955-1963.

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.

Buznikov, G. A; Lambert, H. W; Lauder, J. J. (2001). Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis. *Cell Tissue Res.* 305: 177–86.

Caspi ,A; Sugden, K; Moffitt, T.E; Taylor, A; Craig, I.W; Harrington, H; McClay, J; Mill, J; Martin, J; Braithwaite, A; Poulton, R. (2003). Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science*. 8; 301(5631): 386-389.

Chávez, E; Ontiveros, M; Serrano, U. (2008). Selective serotonin reuptake inhibitors antidepressants (SSRIs). *Salud Mental*. 31 (4): 307-319.

Darcet, F; Mendez-David, I; Tritschler, L; Gardier, A.M; Guilloux, J.P; David, D.J. (2014). Learning and memory impairments in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression. *Front Behav Neurosci*. 8: 136.

Dere, E; Huston, J.P; De Souza Silva, M.A. (2005). Integrated memory for objects, places, and temporal order: evidence for episodic-like memory in mice. *Neurobiol Learn Mem*. 84(3): 214-221.

Fabre ,V; Beaufour, C; Evrard, A; Rioux, A; Hanoun, N; Lesch, K.P; Murphy, D.L; Lanfumey, L; Hamon, M; Martres, M.P. (2000). Altered expression and functions of serotonin 5-HT1A and 5-HT1B receptors in knock-out mice lacking the 5-HT transporter. *Eur J Neurosci*. 12(7): 2299-2310.

Fidalgo, S; Ivanov, D.K; Wood, S.H. (2013). Serotonin: from top to bottom. *Biogerontology*. 14 (1): 21-45.

Llores, J; Armijo, J, A; Mediavilla, A. (1997). *Farmacología humana*. 3<sup>ra</sup> edición. Editorial Masson.

- Fox, M.A; Andrews, A.M; Wendland, J.R; Lesch, K,P; Holmes, A; Murphy, D.L. (2007). A pharmacological analysis of mice with a targeted disruption of the serotonin transporter. *Psychopharmacology*. 195: 147–166.
- Gershon, M.D. (2004). Review article: serotonin receptors and transporters roles in normal and abnormal gastrointestinal motility. *Aliment Pharmacol*. 20 (Suppl 7): 3–14.
- Hammond, R.S; Tull, L.E; Stackman, R.W. (2004). On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem*. 82: 26–34.
- Hariri, A.R; Drabant, E.M; Weinberger, D.R. (2006). Imaging genetics: perspectives from studies of genetically driven variation in serotonin function and corticolimbic affective processing. *Biological Psychiatry*. 59(10): 888-897.
- Harvey, J.A (2003). Role of the Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> Receptor in Learning. *Learn Mem* 10: 355–362.
- Herdegen, T & Leah, J.D. (1998). Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain. Res Rev* 28: 370–490.
- Holmes, A & Wellman, C.L. (2009). Stress-induced prefrontal reorganization and executive dysfunction in rodents. *Neurosci Biobehav Rev*. 33: 773–783.
- Homberg, J. R; Pattij, T; Janssen, M. C. W, et al. (2007c). Serotonin transporter deficiency in rats improves inhibitory control but not behavioural flexibility. *Eur. J Neurosci*. 26: 2066–73.

Hoyer, D & Martin, G. (1997). 5-HT receptor classification and nomenclature: towards a harmonization with the human genome. *Neuropharmacol.* 36(4-5): 419-428.

Izquierdo, A; Brigman, J.L; Radke, A.K; Rudebeck, P.H; Holmes, A. (2016). The neural basis of reversal learning: An updated perspective. *Neuroscience.* 14; 345: 12-26.

Kalueff, A.V; Fox, M.A; Gallagher, P.S; Murphy, D.L. (2007). Hypolocomotion, anxiety and serotonin syndrome-like behavior contribute to the complex phenotype of serotonin transporter knockout mice. *Genes Brain Behav.* 6(4): 389-400.

Kalueff, A & LaPorte, J. (2010). *Experimental Model and Serotonin Research.* Fifth edición. Cambridge University Press. 15-106.

Karabeg, M.M; Grauthoff, S; Kollert, S.Y; Weidner, M; Heiming, R.S; Jansen, F; Popp, S; Kaiser, S; Lesch, K.P; Sachser, N; Schmitt, A.G; Lewejohann, L. (2013). 5-HTT Deficiency Affects Neuroplasticity and Increases Stress Sensitivity Resulting in Altered Spatial Learning Performance in the Morris Water Maze but Not in the Barnes Maze. *PLoS One.* 8(10): e78238.

Kandell E. (2012). *Principles of neural science.* Fifth edición. McGrawHill (62): 1153-1172.

Lesch, K.P; Wolozin, B.L; Murphy, D.L; Reiderer, P. (1993). Primary structure of the human platelet serotonin uptake site: identity with the brain serotonin transporter. *J Neurochem.* 60 (6): 2319–2322.

- Marston, O.J; Garfield, A.; Heisler, L.K. (2011). Role of central serotonin and melanocortin systems in the control of energy balance. *European Journal of Pharmacology*. 660(1): 70-79.
- Meneses, A. (1999). 5-HT system and cognition. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23, 1111–1125.
- Meneses, A. (2015). Serotonin, neural markers, and memory. *Front Pharmacol.* 6: 143.
- Morgado, I. (2005). The psychobiology of learning and memory: fundamentals and recent advances. *Rev Neurol.* 40(5):289-297.
- Murphy, D.L; Lerner, A; Rudnick, G; Lesch, K. P. (2004). Serotonin transporter: gene, genetic disorders, and pharmacogenetics. *Molecular Interventions.* 4(2):109–123.
- Murphy, D.L & Moya, P.R. (2011). Human serotonin transporter gene (SLC6A4) variants: their contributions to understanding pharmacogenomic and other functional G×G and G×E differences in health and disease. *Current Opinion in Pharmacology.* 11(1): 3-10.
- Olivier, J.D; Jans, L.A; Korte-Bouws, G.A; Korte, S.M; Deen, P.M; Cools, A.R; Ellenbroek, B.A; Blokland, A. (2008). Acute tryptophan depletion dose dependently impairs object memory in serotonin transporter knockout rats. *Psychopharmacology* 200: 243–254.
- Ramamoorthy, S & Blakely, R.D. (1999). Phosphorylation and sequestration of serotonin transporters differentially modulated by psychostimulants. *Science*, 285: 763–766.
- Rang, H.P & Dale, M.M. *Farmacología*. 6ª edición. 2008. Elsevier

Roth, B.L; Hanizavareh, S.M; Blum, A.E. (2004) Serotonin receptors represent highly favorable molecular targets for cognitive enhancement in schizophrenia and other disorders. *Psychopharmacology (Berl.)* 174: 17– 24.

Sakakibara, Y; Kasahara, Y; Hall, F.S; Lesch, K.P; Murphy, D,L; Uhl, G.R; Sora, I. (2014). Developmental alterations in anxiety and cognitive behavior in serotonin transporter mutant mice. *Psychopharmacology (Berl.)*. 231(21):4119-4133.

Schulz, D; Huston, J.P; Buddenberg, T; Topic, B. (2007). "Despair" induced by extinction trials in the water maze: relationship with measures of anxiety in aged and adult rats. *Neurobiology of learning and memory* 87: 309–323.

Sik, A; van, N.P; Prickaerts, J; Blokland, A. (2003). Performance of different mouse strains in an object recognition task. *Behav Brain Res.* 147: 49–54.

Sunyer, B; Patil, S; Höger, H; Lubec, G. (2007). Barnes maze, a useful task to assess spatial reference memory in the mice. *Protocol Exchange*.

Tagliabata, G; Hogan, D; Zhang, W.R; Dineley, K.T. (2009). Intermediate- and long-term recognition memory deficits in Tg2576 mice are reversed with acute calcineurin inhibition. *Behav Brain Res.* (1): 95-99.

Terry, AV. Jr; Buccafusco, J.J; Wilson, C. (2008). Cognitive dysfunction in neuropsychiatric disorders: selected serotonin receptor subtypes as therapeutic targets. *Behav. Brain Res.* 195, 30–38.

Uekita, T & Okanoya K. (2011). Hippocampus lesions induced deficits in social and spatial recognition in *Octodon degus*. *Behav Brain Res.* 219(2): 302-309.

Vogel-Ciernia, Wood, M.A. (2014). Examining object location and object recognition memory in mice. *Curr. Protoc. Neurosci.*

Wellman, C.L; Izquierdo, A; Garrett, J.E; Martin, K.P; Carroll, J; Millstein, R; Lesch, K.P; Murphy, D.L; Holmes, A. (2007). Impaired stress-coping and fear extinction and abnormal corticolimbic morphology in serotonin transporter knock-out mice. *J Neurosci.* 27 (3): 684–691.

## 8. ANEXOS

Receptor	Mecanismo de transducción	Potencial	Localización	Cambios en KO	Función
1A	↓ AMPc	Inhibitorio	Corteza cerebral, hipocampo, amígdala, núcleos del rafe, ganglios basales y en el tálamo.	Reducción y desensibilización de receptores en hipotálamo, amígdala, septum y el rafe dorsal.	La activación deteriora el aprendizaje y la memoria. Asociaciones de ubicación de objetos. Usado para alteraciones de la memoria (agonista, antagonista y parcialmente). Mejora la memoria episódica en el reconocimiento de objetos. Memoria de reversión.
1B	↓ AMPc	Excitatorio	Corteza frontal, ganglios basales, estriado y el hipocampo.	Se reduce su densidad en sustancia nigra sin disminuir la proteína G asociada.	Automoldeamiento durante la consolidación de la memoria en una tarea pavloviano e instrumentales de aprendizaje.
1D	↓ AMPc	Excitatorio			
1E	↓ AMPc	Excitatorio			Memoria.
1F	↓ AMPc	Excitatorio	La corteza, el hipocampo y el RN.		Memoria.
2A	↑IP3 y DAG	Excitatorio	Mayoría del cerebro	Se ven reducidos en el striatum y clastrum además del septum e hipotálamo. No hay problemas de densidad en la corteza.	Podrían estar implicados en la formación memoria, probablemente mediando un efecto supresor o de acción. Recuperación de la memoria de reconocimiento de objetos.
2B	↑IP3 y DAG	Excitatorio			Podrían estar implicados en la formación memoria, probablemente mediando un efecto supresor o de acción.
2C	↑IP3 y DAG	Excitatorio	Plexo coroides, amígdala, nucleo abenular lateral, talamo.		
3	Despolarización membrana P. (ionotrópicos)	Excitatorio	El hipocampo, la CE y la corteza frontal y sistema nervioso entérico.	La densidad de receptores 5-HT3 es mayor en la corteza frontal, corteza parietal e Hipocampo CA3	Aprendizaje y memoria
4	↑ AMPc	Excitatorio			Facilita la memoria en tareas de memoria.
5A	↓ AMPc	Inhibitorio			
5B	↓ AMPc	Inhibitorio			
6	↑ AMPc	Excitatorio			
7	↑ AMPc	Excitatorio			Memoria contextual y consolidación aprendizaje. Memoria de reversión

Fig. 1. Tabla principales subtipos de receptores de 5-HT. (Kalueff y LaPorte, 2010), (Meneses, 2015) y (Bekinschtein et al., 2013)

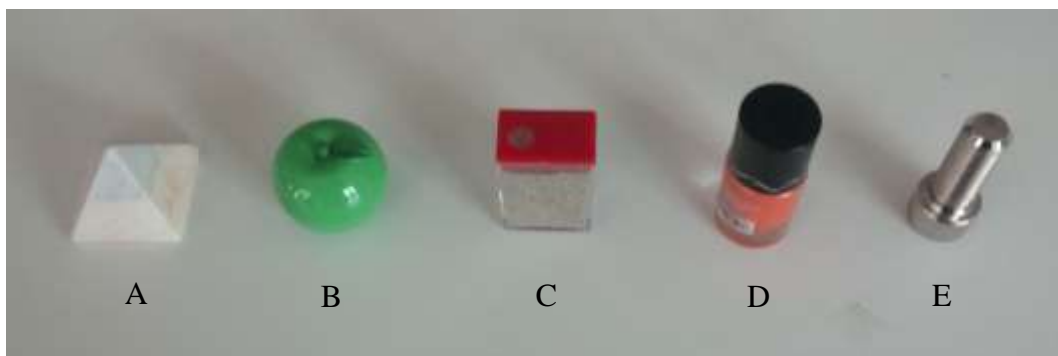


Figura 2. Objetos utilizados para la prueba de reconocimiento de objetos nuevos (NOR). (A) una pirámide de mármol color marfil de 4 cm largo, 4 cm ancho y 4 cm alto; (B) una manzana plástica color verde de 4 cm de diámetro y 4 cm de alto; (C) una caja plástica rellena con arena de 3 cm de largo, 2cm de ancho y 5 cm de alto; (D) un cilindro de vidrio bicolor (negro con naranja) de 3 cm de diámetro y 7 cm de alto; (E) un tornillo metálico plateado de 2,5 cm de diámetro y 6 cm de alto.

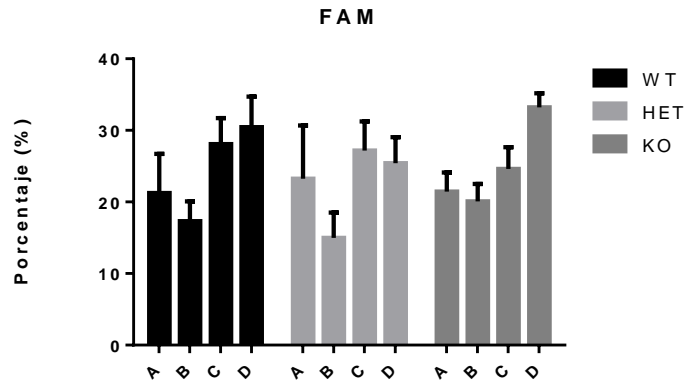


Figura 3. Etapa de familiarización. Los datos están representados como media  $\pm$  SEM (Two-way ANOVA  $F_{(2,83)}$ , seguido de Tukey's post-hoc test. ( $P > 0.05$ ); (HET: n=6; KO: n=9; WT: n=10).

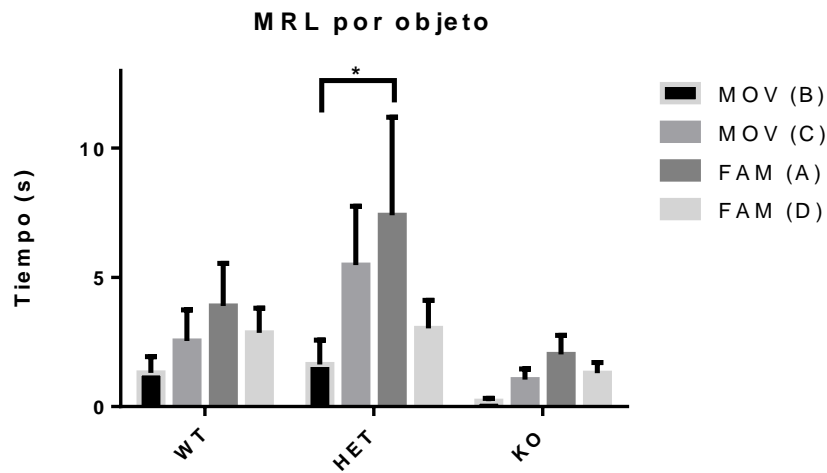


Figura 4. Memoria de reconocimiento de lugar (MRL). Los datos están representados como media  $\pm$  SEM (Two-way ANOVA  $F_{(3,84)}$ , seguido de Tukey's post-hoc test. ( $p = 0.0205$ ); (HET: n=6; KO: n=9; WT: n=10).

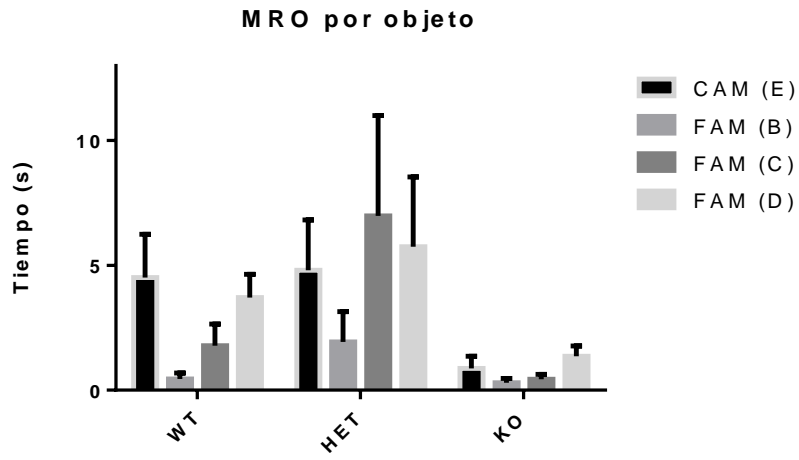


Figura 5. Memoria de reconocimiento de objetos (MRO). Los datos están representados como media  $\pm$  SEM (Two-way ANOVA  $F_{(3,84)}$ , seguido de Tukey's post-hoc test. ( $p = 0.0719$ ); (HET:  $n=6$ ; KO:  $n=9$ ; WT:  $n=10$ ).

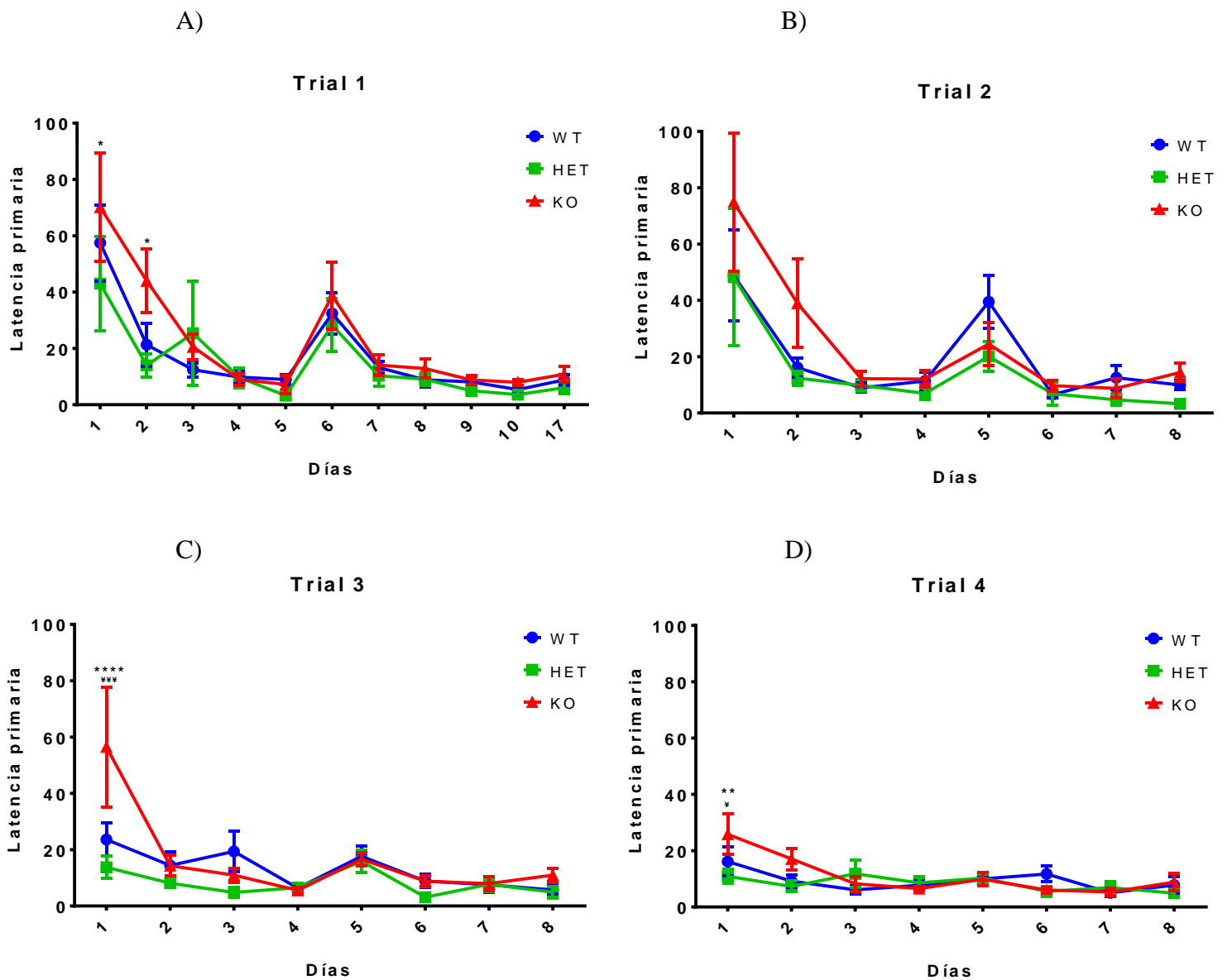


Fig. 6. Latencia primaria. A) Trial 1. B) Trial 2. C) Trial 3. D) Trial 4. Los datos están representados como media  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA  $F_{(2,231)}$  gráfico A;  $F_{(2,170)}$  gráfico B;  $F_{(2,171)}$  gráfico C;  $F_{(2,172)}$  gráfico D, seguido de Tukey's post-hoc test. (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ); (HET:  $n=6$ ; KO:  $n=9$ ; WT:  $n=10$ ). Simbología \* relación HET/KO; ¥ relación WT/KO.

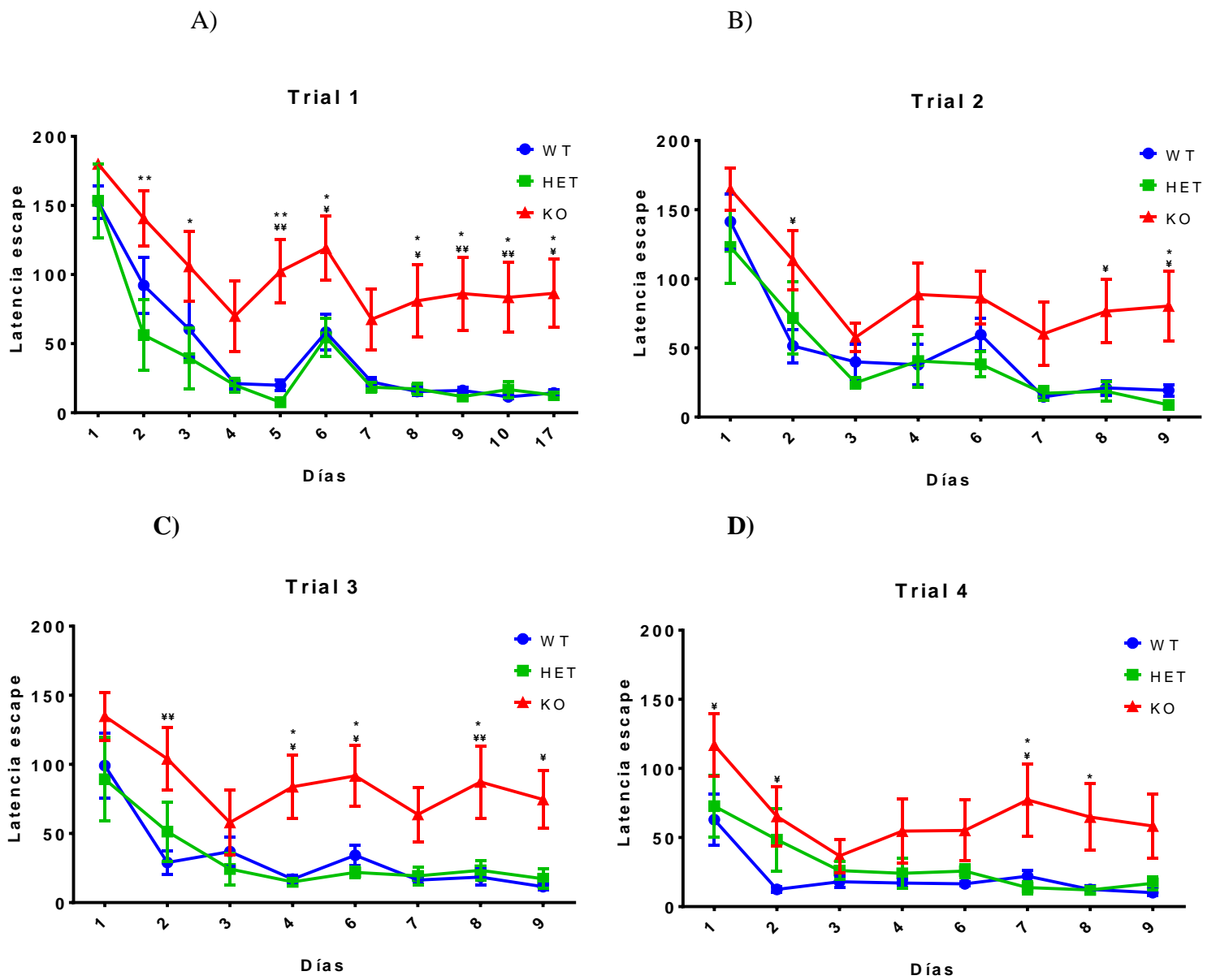


Figura 7. Latencia escape. A) Trial 1. B) Trial 2. C) trial 3. D) Trial 4. Los datos están representados como media  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA  $F_{(2,233)}$  gráfico A;  $F_{(2,172)}$  gráfico B;  $F_{(2,170)}$  gráfico C y  $F_{(2,170)}$  gráfico D, seguido de Tukey's post-hoc test. (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ); (WT: n=10; HET: n=6 y KO: n=9). Simbología ¥ relación KO/WT; \* relación KO/HET.

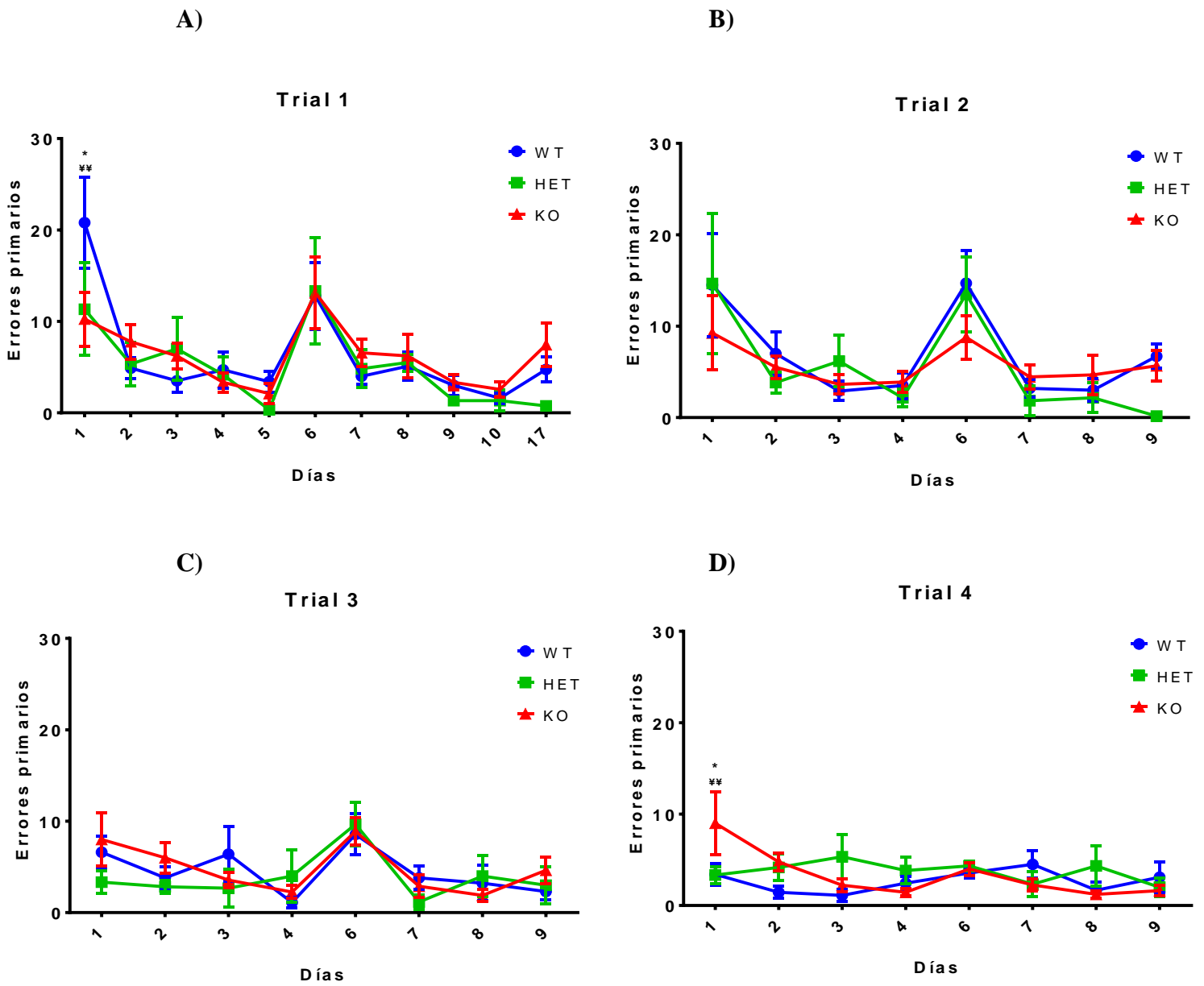


Figura 8. Errores primarios. A) Trial 1. B) Trial 2. C) trial 3. D) Trial 4. Los datos están representados como media  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA  $F_{(2,22a)}$  gráfico A;  $F_{(2,172)}$  gráfico B;  $F_{(2,171)}$  gráfico C;  $F_{(2,169)}$  gráfico D, seguido de Tukey's post-hoc test. (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ); (WT:  $n=10$ , HET:  $n=6$  y KO:  $n=9$ ). Simbología \* relación KO/HET ; ¥ relación KO/WT.