



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUBLA

Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Farmacia
Laboratorio de Neuroquímica

*Efecto de la administración aguda de rotenona sobre
el aprendizaje, la memoria espacial y la expresión de
Sinaptofisina I*

TESIS

Presentada para obtener el grado de
Lic. en Químico Farmacobiólogo

Presenta

p.Q.F.B Jazmín García Moreno

Directores de Tesis

D.C Liliana Martínez Mendieta
Profesora e Investigadora, FCQ-BUAP

D.C María Isabel Martínez García
Profesora e Investigadora, FCQ-BUAP

H. Puebla de Zaragoza, Diciembre 2019

Agradecimientos institucionales



A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, que me permitió comenzar mi formación académica.



El presente trabajo fue apoyado por la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la BUAP a través del proyecto VIEP 2018 otorgado a la D.C Liliana Martínez Mendieta.



Secretaría
de Educación
Gobierno de Puebla

CONCYTEP
Consejo de Ciencia
y Tecnología del Estado
de Puebla

Al Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla por haber otorgado la beca de Tesis CONCYTEP 2019 al presente trabajo.

Agradecimientos académicos

A las directoras de tesis:

D.C Liliana Martínez Mendieta

Por haberme abierto las puertas de su laboratorio sin conocerme, por todo el aprendizaje que me ha impartido. Y sin duda, por la paciencia y apoyo para la realización de este proyecto.

D.C María Isabel Martínez García

Por inspirarme desde el salón de clases, su entusiasmo y dedicación en el aula fueron pieza clave para optar por esta área. Por el apoyo recibido durante las revisiones y las sesiones de estudio y sus sabios consejos.

A la comisión revisora:

D.C I. Daniel Limón Pérez de León

D.C Victorino Alatraste Bueno

M.C Félix Luna Morales

Por las aportaciones y sugerencias que enriquecieron este trabajo, así también por la disposición que tuvieron para que el proyecto se llevase a cabo.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1 El aprendizaje y la memoria.....	1
1.2 La memoria espacial.....	5
1.3 La formación hipocampal.....	5
1.4 El laberinto de Barnes.....	8
1.5 La vesícula sináptica.....	9
1.6 Sinaptofisina I.....	11
1.7 El modelo de rotenona.....	12
2. Justificación.....	18
3. Hipótesis.....	19
4. Objetivo general.....	19
Objetivos específicos.....	19
5. Diagrama de trabajo.....	20
6. Línea del tiempo.....	21
7. Metodología.....	22
7.1 Sujetos experimentales.....	22
7.2 Preparación de soluciones.....	22
7.2.1 Vehículo.....	22
7.2.2 Rotenona.....	22
7.3 Laberinto de Barnes.....	23
7.4 Entrenamiento de las ratonas en el laberinto de Barnes.....	23

7.5 Prueba en el laberinto de Barnes.....	24
7.6 Administración a los grupos experimentales.....	25
7.7 Obtención de tejido nervioso.....	26
7.8 Técnica de inmunohistoquímica para la detección de Sinaptofisina I...	27
7.9 Análisis estadístico.....	27
8. Resultados.....	29
8.1 Efecto de la administración de rotenona sobre la memoria espacial evaluada en el laberinto de Barnes.....	29
8.1.1 La administración aguda de rotenona sobre el aprendizaje y la memoria espacial.....	30
8.2 Efecto de la administración aguda de rotenona sobre la expresión de Sinaptofisina I en el hipocampo de ratona.....	31
9. Discusión de Resultados.....	37
10. Conclusión.....	41
11. Referencias.....	42

1.1 El aprendizaje y la memoria

El aprendizaje y la memoria son propiedades del sistema nervioso que se encuentran íntimamente relacionados. Para formar una nueva memoria se requiere del aprendizaje, que es el proceso por el cual un organismo puede adaptarse a las variables de su medio ambiente, produciendo cambios en el sistema nervioso como resultado de la adquisición de experiencias, mientras que la memoria es el proceso por el que el conocimiento es codificado, almacenado y posteriormente recuperado (Morgado-Bernal, 2011; Kandel, 2014). Sin embargo, Erick Kandel menciona que: “No hay memoria sin aprendizaje, pero hay aprendizaje sin memoria”, aludiendo que podemos aprender cosas y olvidarlas inmediatamente, lo anterior se relaciona con la clasificación de la memoria de acuerdo con el tiempo, es decir, en memoria de corto plazo y memoria de largo plazo (Atkinson y Shiffrin, 1968).

La memoria de corto plazo es efímera, tiene una retención limitada que dura minutos u horas, después de ello es olvidada con facilidad; mientras que la memoria de largo plazo puede almacenar grandes cantidades de información y requiere transcripción de genes, crecimiento sináptico en las terminales pre- y post sinápticas, así como síntesis de nuevas proteínas (Montarolo et al., 1986; Bailey y Chen, 1989; Kandel, 2001). Para que la memoria de corto plazo se transforme en memoria de largo plazo, se requiere del proceso de consolidación, el cual involucra la plasticidad sináptica, que depende de cascadas clave de señalización moleculares (Asok et al., 2019).

La memoria de largo plazo se subclasifica en: memoria declarativa o explícita, que a su vez se subdivide en episódica y semántica, y en memoria no declarativa o implícita (Tulving, 1972; Morgado, 2005; Kandel, Dudai y Mayford, 2014).

La memoria declarativa corresponde al tipo de memoria que permite recordar acontecimientos, números, hechos, detalles de un recuerdo y requiere de un esfuerzo consciente.

La memoria episódica o autobiográfica hace referencia a los acontecimientos y experiencias personales, mientras que la memoria semántica es para hechos, como

el conocimiento objetivo adquirido en la escuela y libros. La formación y recuperación de la memoria declarativa ocurre a través del lóbulo temporal, incluyendo el hipocampo (Brem, Ran y Pascual-Leone, 2013; Aguirre, 2015).

Por otra parte, la memoria implícita almacena habilidades motoras y es inconsciente, se adquiere a través de la repetición y se expresa normalmente en la ejecución. Diferentes estructuras intervienen en su formación de acuerdo al tipo de memoria implícita que corresponda, el estriado (procedimental), la neocorteza (*priming*), la amígdala y el cerebelo (aprendizaje asociativo) y las vías reflejas (aprendizaje no asociativo) (Milner, Squire y Kandel, 1998).



Fig. 1. Clasificación de los tipos de memoria a largo plazo. Tomado y modificado de Kandel, Schwartz y Jessell, 2000; Paul, Magda y Abel, 2009.

Para la formación de una nueva memoria se requiere de un proceso secuencial que involucra tres momentos: 1) la Adquisición de nueva información (codificación), que es el procesamiento inicial de la información que involucra un aumento en la transmisión glutamatérgica entre neuronas, 2) la Consolidación de la información y, finalmente 3) la Recuperación o memoria de la información, es decir, traer de nuevo al presente la información que se adquirió y almacenó.

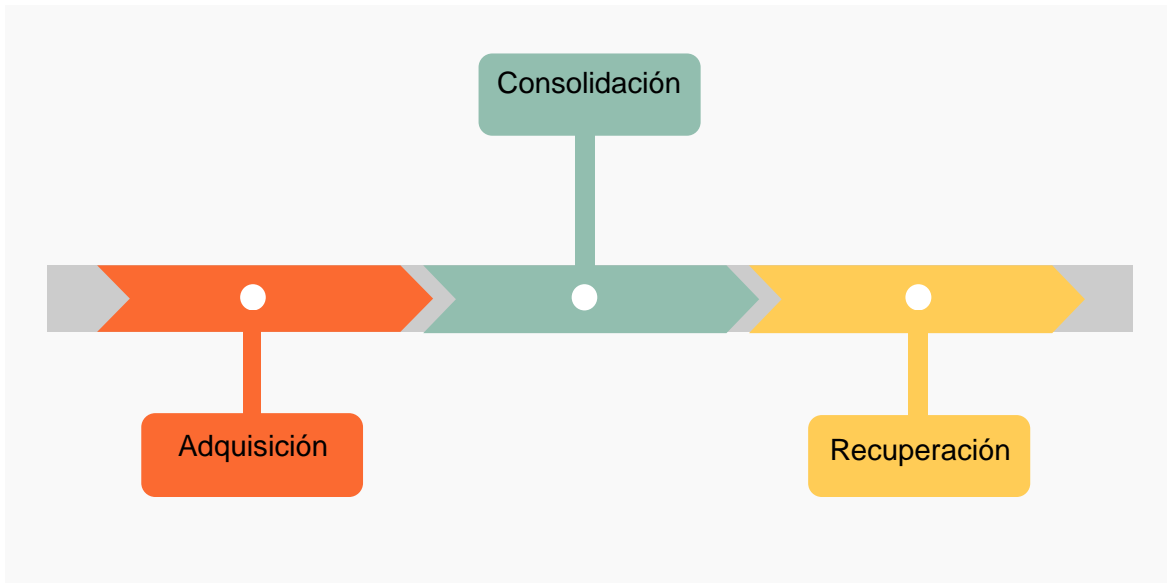


Fig. 2. Formación de una nueva memoria. La formación de una nueva memoria requiere de la adquisición, consolidación y recuperación de la información.

La consolidación sináptica que permite la transición en la memoria de corto a largo plazo, implica la transcripción de genes, proteínas y crecimiento sináptico (Montarolo et al., 1986); resulta del inicio de cascadas de señalización mediadas por la potenciación a largo plazo (PLP), que es modulada por los receptores a glutamato tipo, α -amino-5-hidroxi-3-metil-4-isoxazol ácido propiónico (AMPA) y N-metil D-aspartato (NMDA), las señales que se originan en la membrana post-sináptica sirven como reguladores positivos en las etapas iniciales y tardías de la PLP y la consolidación de memoria.

Los recuerdos a corto plazo requieren una mayor liberación de glutamato presináptico, que modifica la actividad de receptores a glutamato, la unión de glutamato al receptor AMPA permite la entrada de Na^+ que despolariza a la célula, provocando la eliminación de Mg^{2+} que bloquea a los receptores NMDA. Simultáneamente, la unión de glutamato al receptor NMDA, permite que el Ca^{2+} ingrese a la neurona postsináptica. El flujo masivo de Ca^{2+} activa varias proteínas quinasas (Ca^{2+} /Calmodulina dependientes de quinasas – CaMKs, fosfolípidos dependientes de quinasas – PKC, PKA y MAPK) (Kessels y Malinow, 2009; Herring y Nicoll. 2016). La activación de calcio/calmodulina proteína quinasa II (CaMKII),

activa al receptor AMPA para glutamato y la producción de la quinasa A (PKA) en el citoplasma altera la transmisión sináptica.

Por el contrario, en la memoria a largo plazo, el complejo Ca^{2+} /calmodulina activa la enzima adenilciclasa, que promueve la formación de AMPc, que a su vez activa a la PKA que actúa en combinación con la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) sobre la proteína de unión al elemento de respuesta CREB-1 para su fosforilación y, por lo tanto, se activa la expresión génica requerida para la memoria a largo plazo. La respuesta mediada por CREB, puede ser modulada por varias quinasas (PKA, CaMKII, CaMKIV, MAPK y PCK) (Asok et al., 2019). La activación de factor de transcripción CREB regula la transcripción de c-fos y la neurotrofina BDNF además de participar en el crecimiento de nuevas espinas dendríticas.

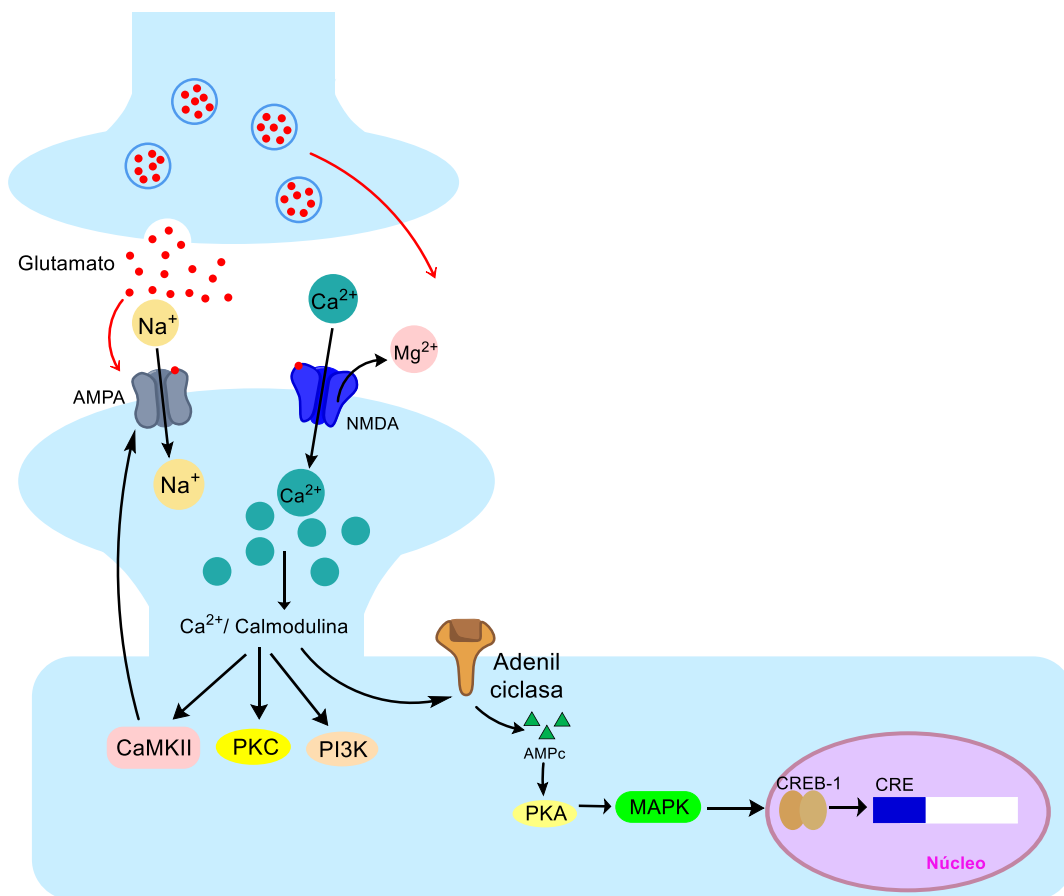


Fig. 3. Vías moleculares de la memoria. La activación de la PLP inicia cascadas de señalización para la síntesis de nuevas proteínas y cambios estructurales. CaMKII: Calcio/calmodulina proteína quinasa II; PKC: Proteína quinasa C; PI3K: Fosfoinositol 3-quinasa; AMPc: Adenosín monofosfato cíclico; PKA: Proteína quinasa A; MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos; CREB-1: Proteína de unión al elemento sensible a AMPc.

1.2 La memoria espacial

La memoria espacial corresponde a la memoria episódica, que es un subtipo de memoria declarativa, ya que la información es almacenada dentro del marco espacio–tiempo (Morellini, 2013; Aguirre, 2015). Este tipo de memoria se adquiere a través del comportamiento exploratorio y permite reconocer, codificar, almacenar y recuperar información acerca de la ubicación de objetos, rutas específicas, y localizaciones espaciales, estos elementos proporcionan a cualquier organismo la capacidad de desarrollarse en nuevos entornos.

La información que se obtiene de un espacio está organizada por dos tipos de sistemas: el sistema taxón y el sistema local (O'Keefe y Nadel, 1978). El primero se basa en estrategias egocéntricas, es decir, el sujeto funciona como su propio punto central de referencia por lo que las posiciones de otros objetos se relacionan directamente con la posición del sujeto en el espacio. El segundo hace referencia a estrategias alocéntricas, es decir, depende de las señales espaciales, la ubicación de un objeto se establece por un sistema de coordenadas que son independientes del sujeto (Paul, Magda, y Abel, 2009; Bannerman et al., 2014) .

Con lo que respecta a la resolución de laberintos, se emplean estrategias alocéntricas, ya que los roedores crean representaciones globales del entorno para ubicar el objeto meta dentro del laberinto, formando mapas cognitivos (Tolman, 1948), que son mantenidos en el hipocampo, específicamente en las células de lugar como unidad básica funcional, ya que aumentan su velocidad de disparo cuando un animal se encuentra en una ubicación espacial específica (O'Keefe y Conway, 1978).

1.3 La formación hipocampal

El hipocampo es la estructura cerebral relacionada con la memoria espacial, que fue sugerido en la teoría del mapa cognitivo de O'Keefe y Nadel (1978). Diferentes estudios evidencian su importancia en este tipo de memoria, como los reportes a

partir del paciente H.M (Squire y Wixted, 2011).

Las estructuras importantes son el hipocampo propiamente dicho que consta de los cuernos de Amón (CA1, CA2 y CA3), la circunvolución dentada o giro dentado (GD), el complejo subicular y la corteza entorrinal (que en conjunto comprenden la formación hipocampal) y las áreas corticales adyacentes (corteza perirrinal y parahipocampal) (Milner, Squire, y Kandel, 1998; Aguirre, 2015). La formación hipocampal en el cerebro de ratón se extiende sobre el eje rostro-caudal y posteriormente hacia el eje dorsoventral, formando una invaginación (Strange, Witter, Lein, y Moser, 2014).

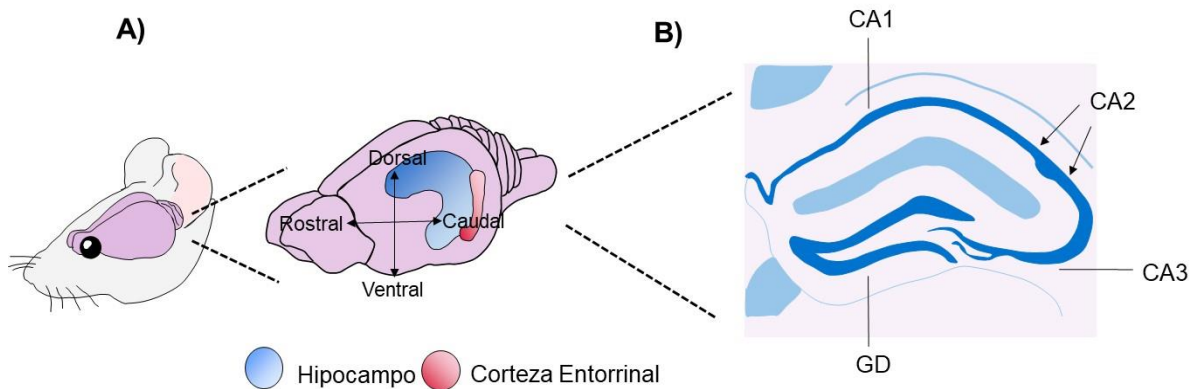


Fig 4. Estructura hipocampal en el cerebro de ratón. A) La formación hipocampal se extiende sobre el eje rostro-caudal y posteriormente hacia el eje dorsoventral. **B)** Por medio de un corte coronal se muestra el hipocampo que consta de las regiones CA1, CA2 y CA3, y el GD. Tomado y modificado de Strange, Witter, Lein, y Moser, 2014.

Las regiones del CA1, CA2, CA3 y el GD, están comunicadas a través del circuito trisináptico (Fig. 5), cuya primera conexión es constituida por la proyección cortico-hipocampal, denominada vía perforante, en la cual, la capa II de la corteza entorrinal (medial y lateral) envía proyecciones a la capa molecular del GD y al CA3, y la capa III a las células piramidales de CA1. En la segunda conexión, las células granulares del GD se proyectan a través de las fibras musgosas (vía de las fibras musgosas) a las células piramidales del CA3, y en la tercera conexión, las células piramidales del CA3 proyectan hacia sí misma, así como a CA1 a través de las colaterales de Schäfer. Finalmente, CA1 funciona como salida primaria del hipocampo al

proyectarse hacia el subículo y a la corteza entorrinal (Knierim, 2015; Hunsaker y Kesner, 2018).

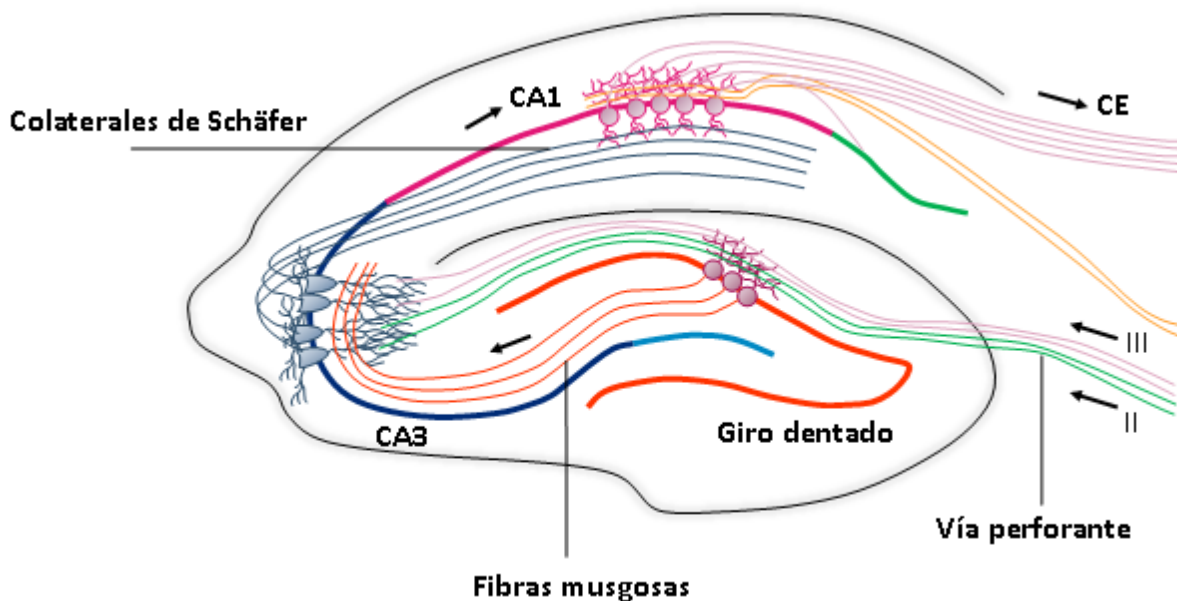


Fig. 5. Circuito neuronal en el hipocampo de roedores. La corteza entorrinal (CE) (lateral y medial) proyecta hacia el GD a través de la vía perforante. El GD envía proyecciones a las células piramidales en CA3 a través de las fibras musgosas y las neuronas piramidales de CA3 transmiten la información a las neuronas piramidales de CA1 a través de las colaterales de Schäfer. CA1 envía proyecciones a la CE. CA3 también recibe proyecciones directas de la capa II de la CE, así como CA1 recibe proyecciones de la capa III de la CE. Tomado y modificado de Deng, Aimone, y Gage, 2010.

Estudios sugieren diferencias importantes en la función de las regiones hipocampales. Por ejemplo, la lesión del GD en ratas sugiere su importancia en la codificación de la información, mas no en la formación de la memoria (Kesner, Taylor, Hoge, y Andy, 2015), además, presenta la capacidad para la neurogénesis, tanto en condiciones normales como patológicas (Kesner, 2018). Lesiones en la región CA3 exhiben déficit en la codificación de la información, pero no en la recuperación, así como su importancia en los procesos de la memoria espacial, específicamente en la consolidación de la misma (Florian y Roulet, 2004; Jerman, Kesner, y Hunsaker, 2006). Respecto a CA2, se ha considerado solo la región de

conexión entre CA3 y CA1, sin embargo, a partir de nuevos estudios se le ha considerado como entrada moduladora que procesa información de la corteza entorrinal y CA3 (Benoy, Dasgupta, y Sajikumar, 2018). Por último, lesiones en la región CA1 también describen su importancia en la codificación y recuperación de la información espacial (Tsien, Huerta, y Tonegawa, 1996)

Las diferencias entre las regiones no solo se limitan por su función, sino también por la naturaleza de sus células, por ejemplo, se sabe que las células granulares del GD son más resistentes a condiciones ofensivas que las células piramidales de la región CA1 (Alkadhi, 2019).

Así mismo, la inducción de la PLP es esencial para codificar asociaciones de eventos y ubicaciones específicas dentro de un mapa específico (Martin, Grimwood y Morris, 2000). En el primer estudio para conocer el papel de la PLP en las formas del aprendizaje dependiente del hipocampo, Morris y colaboradores (1986), usaron ratas tratadas con un antagonista del receptor NMDA para bloquear la formación de la PLP en el hipocampo y consecuentemente la capacidad del animal para aprender una nueva ubicación espacial en el laberinto de agua.

1.4 El laberinto de Barnes

Los laberintos son modelos experimentales empleados para la evaluación de la memoria espacial en roedores, ejemplo de ello es el Laberinto de Barnes (LB), que fue creado por Carol Barnes. A pesar que el dispositivo fue originalmente diseñado para ser utilizado por ratas, experimentó modificaciones para también ser empleado en ratones, y se le ha considerado apropiado para esta especie por su capacidad para encontrar y escapar a través de pequeños orificios (Paul, Magda y Abel, 2009). Este dispositivo permite medir si un factor aberrante (mutación genética, variable ambiental, etc.) afecta la adquisición y retención de recuerdos espaciales, también proporciona información acerca del comportamiento exploratorio del ratón y de la motivación para escapar de la plataforma del laberinto.

Si bien existen otros laberintos para la evaluación de la memoria espacial, estos utilizan fuertes estímulos aversivos como refuerzo, como la privación de alimentos o el estrés inducido por natación forzada en el caso del laberinto de Morris, aunque el LB proviene de la idea del laberinto acuático de Morris, presenta ventajas sobre éste al ser menos estresante, causando niveles menos elevados de corticosterona en ratones (Harrison, Hosseini y McDonald, 2009).

El LB consiste en que los roedores aprendan la ubicación del agujero de escape seleccionado por el investigador, con el fin de escapar de la plataforma brillante y abierta. Se aplica un estímulo aversivo débil (luz y la propia altura del dispositivo) para aumentar la probabilidad de que el roedor escape de la plataforma. El protocolo empleado en el LB consiste en la fase de habituación, la fase de entrenamiento en la cual el ratón recibe numerosas pruebas para aprender la tarea y la fase de prueba que se puede realizar después de 24 horas del último ensayo, en la cual se prueba al roedor para recordar lo aprendido previamente, si la tarea fue adquirida correctamente habrá una disminución en la latencia de escape (Attar et al., 2013; Ingersoll et al., 2018).

1.5 La vesícula sináptica

La comunicación entre la terminal presináptica y la terminal postsináptica por estímulos eléctricos o químicos es denominada sinapsis. En la mayoría de los casos, la terminal presináptica es localizada en las terminales axónicas, en donde se encuentran los neurotransmisores (estímulo químico) almacenados en vesículas sinápticas. La terminal postsináptica es localizada en la superficie del cuerpo celular de la dendrita, en cuya membrana se encuentran los receptores de neurotransmisores. La liberación de los neurotransmisores es mediada por la vesícula sináptica (VS), que es el principal mecanismo de transferencia de información neuronal (Südhof, 2004). La VS es pequeña (radio de 17-22 nm) y almacena neurotransmisores no peptídicos como glutamato, acetilcolina, glicina, etc. En la membrana de las VS se encuentran diferentes proteínas (Fig. 6)

involucradas en la fusión de su membrana con la membrana de la terminal presináptica para liberar los neurotransmisores, así como para su posterior endocitosis y reciclaje.

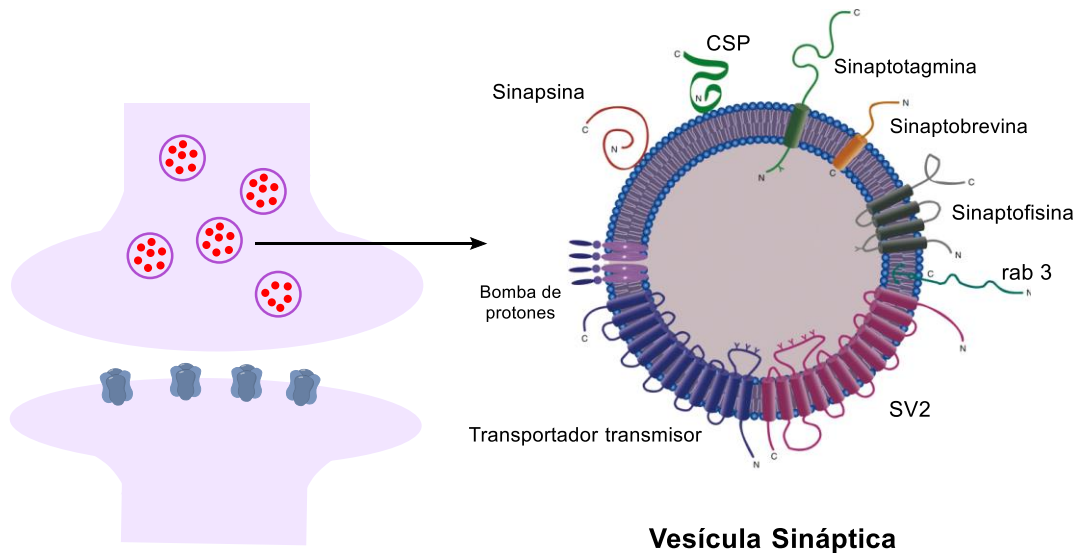


Fig 6. Proteínas de la vesícula sináptica. En la membrana de la vesícula sináptica se ubican diferentes proteínas involucradas en el ciclo de la vesícula sináptica como VAMP/Sinaptobrevina, que es parte del complejo SNARE. Sinaptotagmina, componente de acoplamiento a los sitios de liberación al interactuar con el complejo SNARE. Rab3, que participa en la regulación y disponibilidad de las vesículas. Además están presentes otras proteínas como Sinapsina, SV2 y Sinaptofisina.

Dichas proteínas realizan un papel fundamental en el ciclo exo-endocitótico de la VS (Fig. 7), que comprende: 1) la captación de neurotransmisores en las vesículas sinápticas, 2) la orientación de las VS a los sitios de lanzamiento, 3) el acoplamiento (Docking) de la membrana de la VS a la zona activa, 4) el cebado o pre-activación, que es la preparación para fusionarse con la membrana plasmática a la llegada del impulso de Ca^{2+} , 5) la fusión (exocitosis), es decir, la liberación del contenido de la VS, y 6) la endocitosis, que se refiere a la recuperación de la membrana de la VS (Sudhof, 2004; Valtorta, Pennuto, Bonanomi, y Benfenati, 2004).

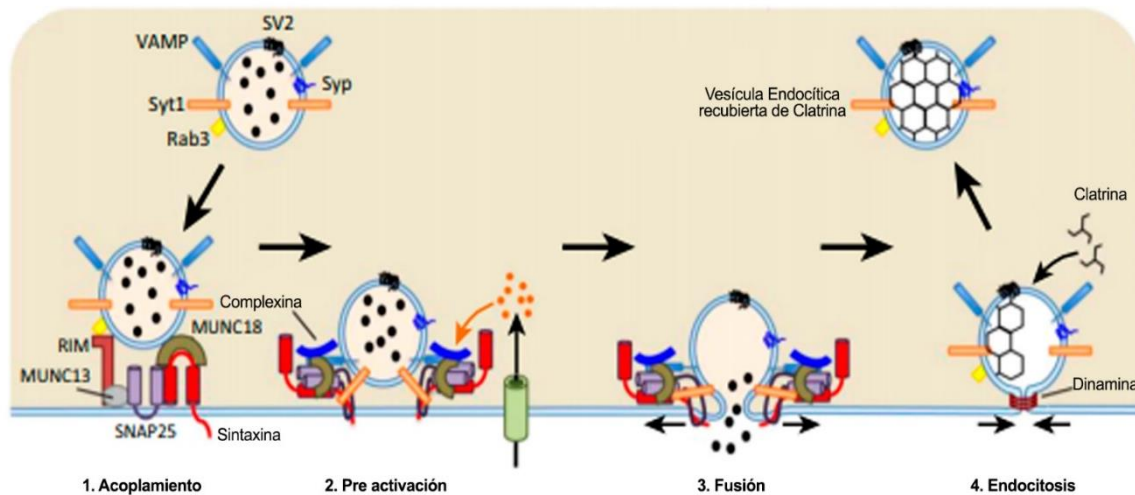


Fig 7. Mecanismo de liberación de neurotransmisores y reciclaje de vesículas sinápticas. 1) Acoplamiento. Se muestran las proteínas de la VS en contacto con el complejo SNARE (Syntaxina, SNAP25, y VAMP) y los efectores de SNARE (MUNC). **2)** Pre-activación. Sinaptofisina detecta el aumento de las concentraciones presinápticas de Ca²⁺. Las proteínas del complejo cambian su conformación e induce a la VS a fusionarse con la membrana plasmática. **3)** Fusión y liberación. La VS libera los neurotransmisores. **4)** Endocitosis. La VS vacía es recubierta con clatrina y la escisión de la membrana plasmática es impulsada por dinamina. Tomado y modificado de Abad-Rodríguez y Díez-Revuelta, 2015.

1.6 Sinaptofisina

Sinaptofisina (Syp) es una glicoproteína transmembrana que se encuentra en vesículas presinápticas de las células nerviosas, es la más abundante en masa, representado aproximadamente el 10% de la proteína vesicular total (Takamori et al., 2006). Pertenece a una familia de proteínas con cuatro dominios transmembrana que incluye Sinaptogirina y SCAMP (Südhof et al., 1987). Syp es expresada en dos isoformas en el cerebro, Syp I y Syp II (también llamada sinaptoporina) (Fykse et al., 1993). La primera se encuentra ampliamente distribuida en las áreas cerebrales, mientras que la segunda está limitada en algunas áreas como el prosencéfalo y lámina I-II de la médula espinal (Marquèze-Pouey et al., 1991; Sun et al., 2006).

Su localización en las terminales presinápticas, permite que sea empleada en la cuantificación de sinapsis y con frecuencia se considera un marcador de densidad

sináptica (Takamori et al., 2006). Respecto a su función es variada, puesto que Syp está involucrada en aspectos de la exo-endocitosis de la VS. En la parte excitotónica, Syp detecta las concentraciones presinápticas de Ca^{2+} ; y actúa como regulador negativo de la fusión de vesículas al unirse con Sinaptobrevina e impedir su disponibilidad para formar el complejo de fusión SNARE VAMP/Sinaptobrevina (Pennuto et al., 2002). Respecto al proceso endocitótico, interacciona con dinamina en el sitio de liberación de forma dependiente de calcio para promover la recuperación rápida de vesículas sinápticas no dependientes de clatrina (Daly y Ziff, 2002).

La Syp es la principal fosfoproteína de tirosina en la VS, ya que en su dominio citoplasmático C-terminal contiene nueve repeticiones de pentapéptidos que comienzan con un residuo de tirosina (Südhof et al., 1987), la fosforilación es intravesicular y es mediada por la tirosina quinasa src. A partir de ello, se ha sugerido que la fosforilación de tirosina de Syp es requerida para la PLP. Si bien la importancia de la fosforilación de tirosina en la PLP es de carácter postsináptico, dado que src es necesaria para la inducción de la PLP en CA1 a través de la regulación positiva del receptor NMDA (Purcell y Carew, 2003; Kalia, Gingrich, y Salter, 2004), Mullany y Lynch (1998), hallaron que la fosforilación de Syp aumentó en paralelo con la liberación de glutamato en sinaptosomas obtenidos de cortes de hipocampo previamente estimulado, así como otros estudios demuestran una disminución de Syp en regiones del hipocampo o Giro Dentado, a partir de lesiones neuronales (Sun et al., 2007) o relacionado con la edad (Smith et al., 2000). En contraste, otros estudios reportan el incremento de la expresión de Syp en modelos de Alzheimer (King y Arendash, 2002), después de estrés crónico en neuronas hipocámpales y después de una situación de estrés en el laberinto de Morris (Gao et al., 2006; Benice et al., 2006), posiblemente por un mecanismo compensatorio del deterioro cognitivo.

1.7 El modelo de Rotenona

La rotenona (ROT) es un pesticida natural que pertenece a la familia de los rotenoides, compuestos citotóxicos naturales extraídos de plantas de las especies *Lonchocarpus*, *Derris*, *Thephrosia* y *Mundulea*. Su uso es variado, ya que es utilizado como control de insectos en huertos, de piojos y garrapatas en mascotas, así como piscicida, entre otros, sin embargo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) la ha clasificado como un pesticida de clase II moderadamente peligroso (OMS, 1988).

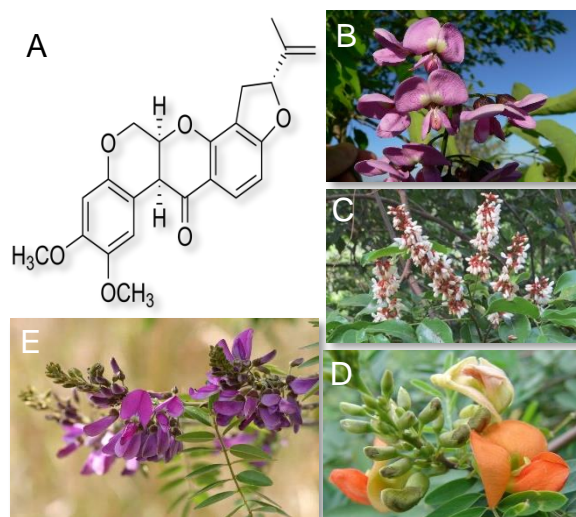


Fig 8. Rotenona. En **A** se presenta la molécula de rotenona, así como las plantas de las cuales es extraída la rotenona: **B)** *Lonchocarpus* **C)** *Derris* **D)** *Mundulea* y **E)** *Thephrosia*.

En los últimos años, la ROT ha tenido gran relevancia ya que se han relacionado con enfermedades neurodegenerativas con su exposición (Betarbet et al., 2000; Spivey 2011; Hancock et al., 2008; Wang et al., 2018). Por esta razón, desde la década de 1980 se utilizó por primera vez en la investigación de la Enfermedad de Parkinson (Heikkila et al., 1985), y hasta la fecha es utilizada como una sustancia experimental para reproducir disfunción mitocondrial y reproducir características de enfermedades neurodegenerativas en modelos animales. La ROT, es altamente

lipófila, por lo que atraviesa fácilmente todas las membranas biológicas, incluida la barrera hematoencefálica, ya que es independiente de transportadores para su entrada a las células (Talpade et al., 2000; Martínez y Greenamyre, 2012).

La toxicidad de la ROT se debe a que es un potente inhibidor del complejo mitocondrial I (Fig. 9) (Singer y Ramsay, 1994; Xiong et al., 2012), que provoca una reducida producción de ATP y conduce a la pérdida neuronal, así mismo, altera la señalización de calcio y reduce enzimas antioxidantes como glutatión, que es la defensa principal para cualquier daño oxidativo, por lo que la disminución en sus niveles produce directamente la aparición de estrés oxidativo que en consecuencia conduce a la muerte neuronal (Betarbet et al., 2006; Xiong et al., 2012; Verma et al., 2018). Así mismo, el papel inhibitorio en la polaridad neuronal afecta al citoesqueleto, ya que la rotenona se une reversiblemente a la tubulina para prevenir el ensamblaje de los microtubulos, implicando la despolimerización de los microtubulos que produce la interrupción del transporte vesicular a través de los mismos, provocando por consecuencia la acumulación de vesículas sinápticas (Bisbal y Sanchez, 2019).

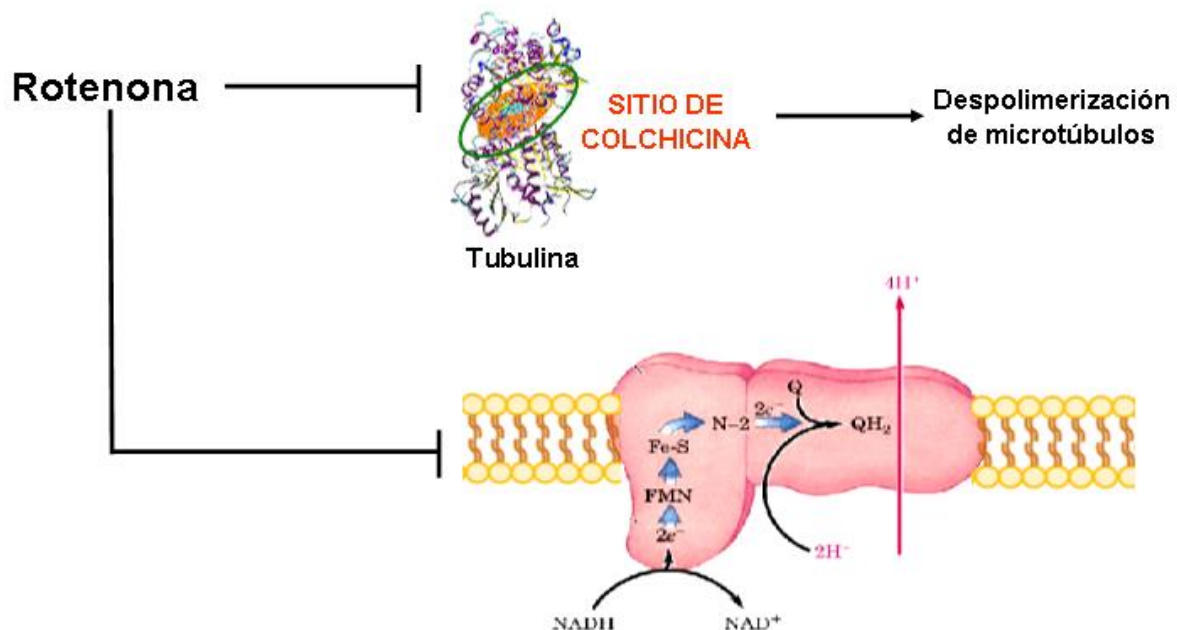


Fig. 9. Mecanismo de acción de la rotenona. La rotenona atraviesa la membrana celular y entra en la mitocondria inhibiendo el complejo mitocondrial I, lo que provoca la generación de ROS, así como la liberación de Cit C y activa las caspasas que inducen la apoptosis. De igual manera interactúa con la tubulina uniéndose al sitio de colchicina, alterando la polimerización de los microtubulos. Tomado y modificado de Bisbal y Sanchez, 2019.

Estudios realizados en modelos animales revelan el efecto adverso de la exposición o administración de rotenona en diferentes áreas del cerebro. En el trabajo de Bhurtel y colaboradores (2019), al administrar a ratones C57BL/6 con rotenona (2.5 mg/kg v.ip) por 6 días, hubo neurodegeneración en las regiones del CA3 y GD del hipocampo de los ratones después del tratamiento con rotenona, evidenciado por medio de la tinción de Fluoro Jade C, al haber un incremento de neuronas positivas en comparación con los ratones control o tratados con MPTP (Fig. 10).

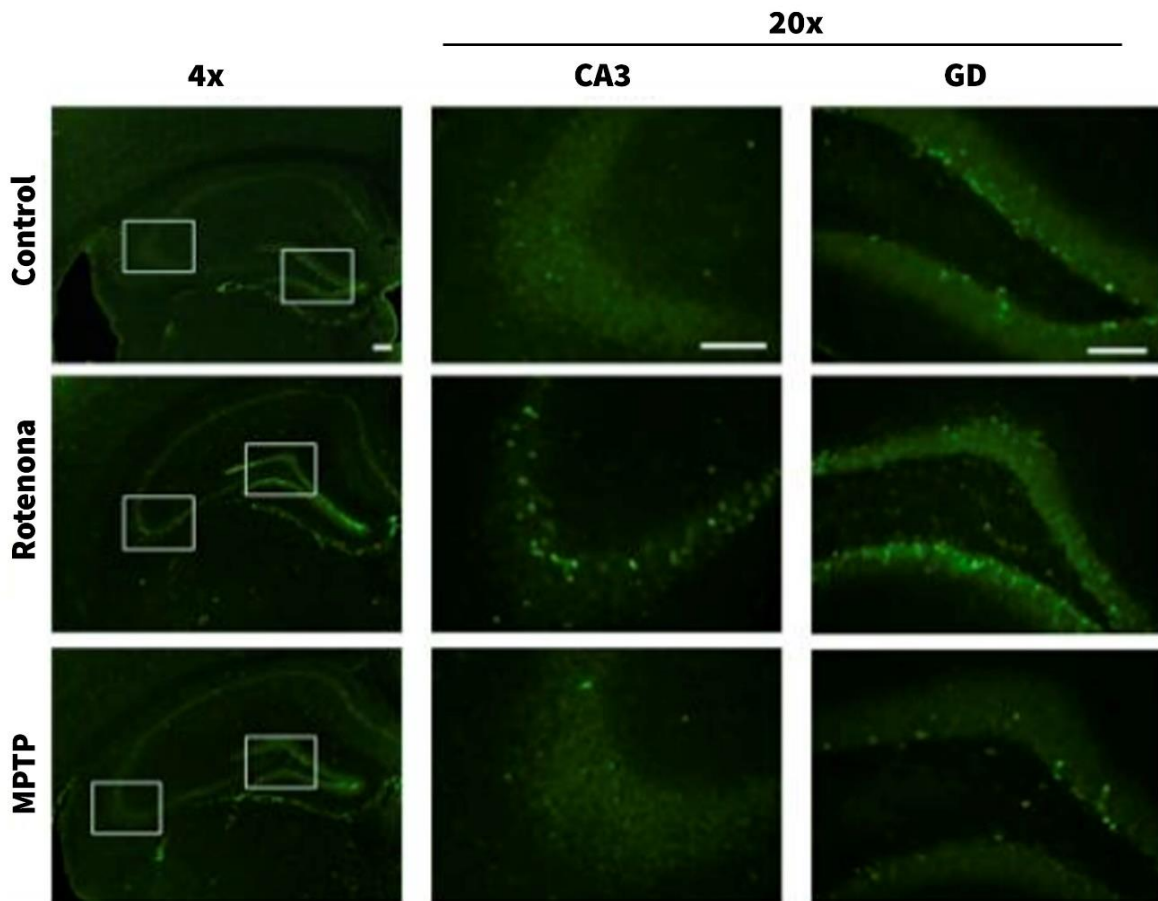


Fig. 10. Neurodegeneración del hipocampo después del tratamiento con rotenona. La neurodegeneración fue evidenciada por la tinción de Fluoro Jade C, las micrografías muestran un incremento en el número de neuronas positivas en las regiones del CA3 y GD. Tomado y modificado de Bhurtel et al., 2019.

Así como también produce cambios en la actividad eléctrica del hipocampo, reduciendo la actividad neuronal, y generando un incremento de neuronas no reactivas y por lo tanto, disminución del funcionamiento sináptico (Darbinyan et al., 2017).

Por otro lado, pocos han sido los estudios realizados en relación con la evaluación del aprendizaje y la memoria y específicamente de la memoria espacial, sin embargo, existe evidencia acerca del deterioro de la memoria espacial evaluada en la prueba de laberinto en T elevado, después de administrar ROT durante cinco días por vía subcutánea (3 mg/kg) a ratas macho Wistar (Fig. 11) (Linard-Medeiros et al., 2015); así como se evidencian alteraciones en la memoria de ratas Wistar por medio de la prueba de reconocimiento de objetos, en un modelo de toxicidad inducido por la administración bilateral intranigral de ROT (12 μ / μ L) (Dos Santos et al., 2013).

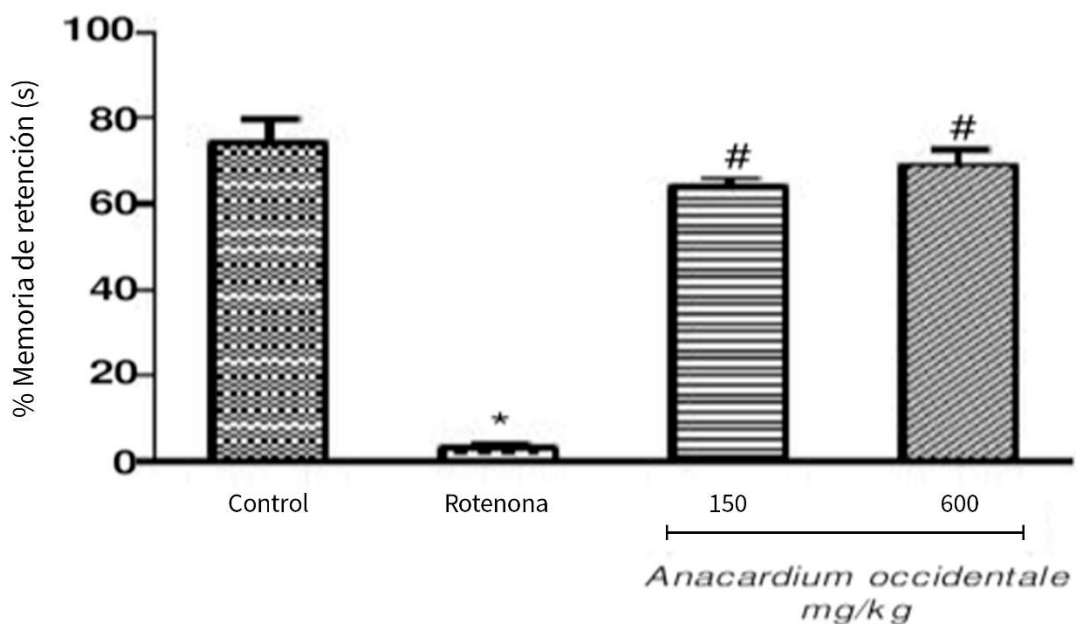


Fig. 11. Efecto de la rotenona en el rendimiento de la memoria espacial medido en el laberinto en T elevado. $p < 0.05$ * Estadísticamente significativo en comparación con el grupo rotenona. Tomado y modificado de Linard-Medeiros et al., 2015.

También se ha investigado la acción de la rotenona sobre la expresión de Sinaptofisina I, sin embargo, aún no hay estudios que evalúen la expresión de este marcador en la región hipocampal, aunque sí en regiones como el estriado o la

substancia nigra, dando como resultado que la administración de rotenona (3 mg/kg) por vía subcutánea durante ocho días a ratas macho wistar, disminuye la expresión de Syp en el estriado (Fig.12) (Serrano-García et al., 2018).

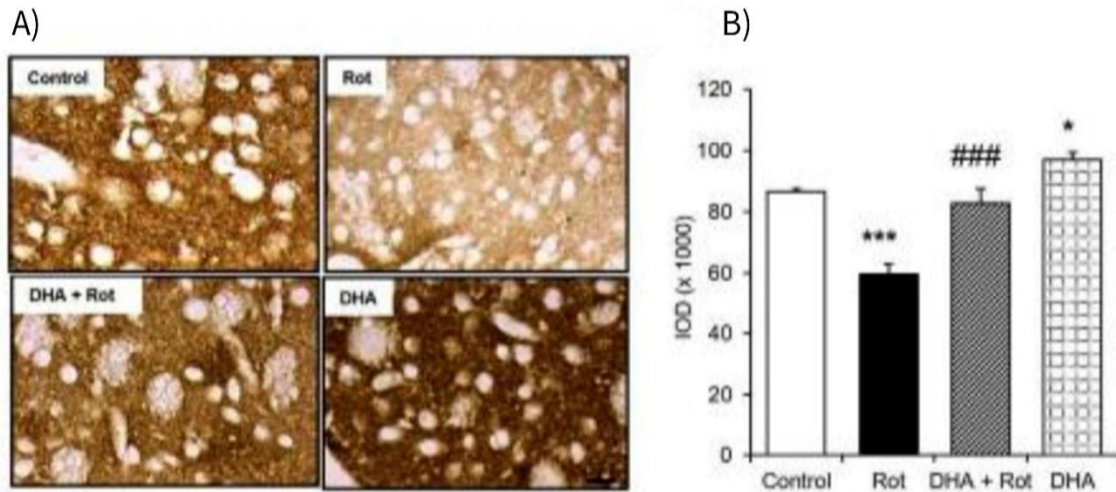


Fig. 12. Efecto de la rotenona y del ácido docosahexaenoico (DHA) sobre la expresión de Sinaptofisina I. Imágenes representativas de A) Sinaptofisina en el estriado. B) Cuantificación de Sinaptofisina I en el estriado. Tomado y modificado de Serrano-García et al. 2018.

2. Justificación

La rotenona es utilizada como neurotóxico para el estudio de enfermedades neurodegenerativas (Betarbet et al., 2000; Hancock et al., 2008; Wang et al., 2018), ya que se ha comprobado que es un inhibidor potente del complejo mitocondrial I (Singer y Ramsay, 1994; Xiong et al., 2012), que afecta el funcionamiento celular, produciendo disfunción mitocondrial, estrés oxidativo, estrés nitrosativo y neuroinflamación (Abdin y Hamouda, 2008; Khadrawy et al., 2017; Wang et al., 2018), que pueden conducir a la muerte neuronal, y a los síntomas de enfermedades neurodegenerativas. Así mismo, se ha reportado el efecto adverso de la rotenona sobre el hipocampo (Darbinyan et al., 2017; Verma et al., 2018), mostrando ser más susceptible a su exposición en las regiones del CA3 y el GD al presentar alto porcentaje de muerte neuronal comparado al uso de MPTP (Bhurtel et al., 2019). Presumiblemente las células hipocámpales son de las más vulnerables al estrés oxidativo (Wilde et al., 1997; Wang et al., 2005), y en consecuencia, a sufrir deterioro en el aprendizaje y la memoria. Diversos estudios han informado sobre el daño de la memoria en ratas tratadas con rotenona, misma que se ha evidenciado mediante la prueba de reconocimiento de objetos (Dos Santos et al., 2013), así mismo, un estudio informó un defecto en la memoria espacial en ratones por exposición a este neurotóxico (Linard-Medeiros et al., 2015).

Por otro lado, la Syp se ha utilizado como un marcador para la cuantificación de la sinapsis, permitiendo que la alteración de la sinapsis por un daño en el sistema pueda ser dilucidado con este marcador (Schmitt et al., 2009). También, se ha utilizado a Syp como un marcador proteico de plasticidad sináptica, por lo que la pérdida de esta proteína en las vesículas presinápticas del hipocampo se correlaciona con el deterioro cognitivo (Schmitt et al., 2009), por otro parte, también se han reportado estudios en donde en condiciones negativas la expresión de Syp aumenta (Gao et al., 2006; Benice et al., 2006).

Considerando lo anterior, resulta relevante determinar si una administración de rotenona afecta los procesos de adquisición, consolidación o recuperación de una tarea espacial, así como si la toxicidad de la rotenona modifica la expresión de la Sinaptofisina I en el hipocampo de ratón.

3. Hipótesis

La administración aguda de rotenona por vía intraperitoneal deteriora el aprendizaje y la memoria espacial y, disminuye la expresión de Sinaptofisina I.

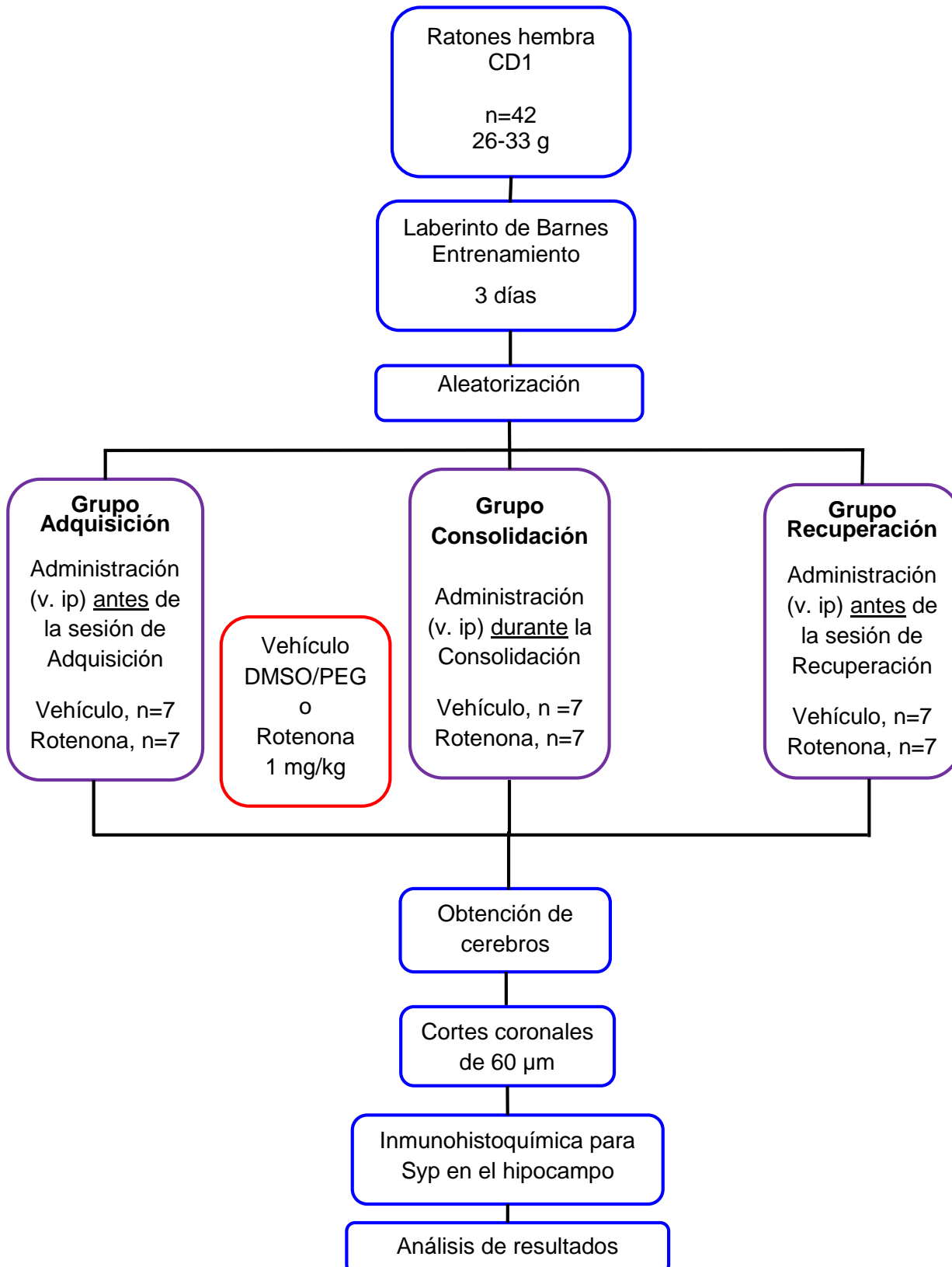
4. Objetivo general

Determinar el efecto de la administración aguda de rotenona sobre el aprendizaje y la memoria espacial, así como de la expresión de Sinaptofisina I en ratón.

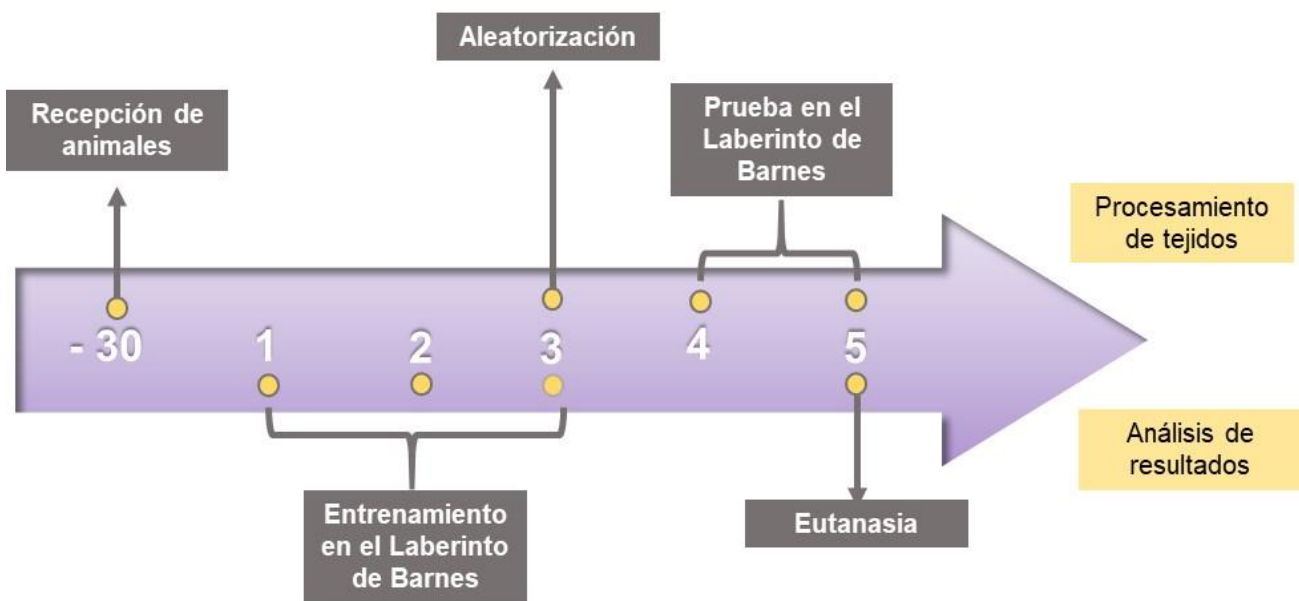
Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de la administración aguda de rotenona en dosis de 1 mg/kg sobre la adquisición, la consolidación y la recuperación en una tarea espacial.
2. Determinar el efecto de la administración aguda de rotenona sobre la expresión de Sinaptofisina I en el hipocampo.

5. Diagrama de trabajo



6. Línea del tiempo



Sujetos experimentales

En este trabajo se emplearon 42 ratonas de la cepa CD1 provenientes del Bioterio “*Claude Bernard*” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, las cuales fueron alojadas en el vivario del Laboratorio de Neuroquímica y manejadas bajo las estipulaciones de la Norma Oficial Mexicana 062 (NOM-062-ZOO-199) (Diario Oficial de la Federación. Estados Unidos Mexicanos 2001). Durante su estancia en el vivario, fueron colocadas en cajas de acrílico (4 por caja), teniendo acceso libre a alimento y agua, y manteniendo condiciones de ciclos de luz-oscuridad de 12/12 horas, temperatura de 24 ± 2 °C y humedad relativa de $45 \pm 10\%$ de humedad.

Los sujetos fueron aleatorizados para la formación de los siguientes grupos experimentales: Adquisición, Consolidación y Recuperación, cada uno con su respectivo grupo Vehículo (n=7) (DMSO-PEG 1:1; v.ip.) y Rotenona (n=7) (1mg/kg; v.ip.).

Preparación de soluciones

Vehículo

Se preparó una mezcla en relación 1:1 de Dimetil Sulfóxido (DMSO) 2.5 mL y 2.5 mL de Polietilenglicol (PEG) para obtener un volumen total de 5 mL. Posteriormente se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso.

Rotenona

Se pesaron 0.75 mg de rotenona que fueron disueltos en 2.5 mL de vehículo PEG y DMSO 1:1, obteniendo una concentración de 0.6 mg/ml. La rotenona fue almacenada en microtubos a -20°C hasta su uso.

Laberinto de Barnes

El laberinto de Barnes (LB) consiste en una plataforma circular de acrílico blanco de 1 m de diámetro y 90 cm de alto, cuenta con 18 orificios (8.5 cm de diámetro cada uno) ubicados en la periferia. Los orificios se encuentran abiertos a excepción de uno, el cual fue elegido como agujero de escape, en el que se ubicó una caja negra de acrílico, con dimensiones de 9.5 cm de ancho, 18 cm de largo y 9 cm de altura. Como estímulo aversivo se utilizó una lámpara de luz blanca, así como también se emplearon cuatro señales extra laberínticas distribuidas en los cuatro puntos cardinales de la zona de experimentación.

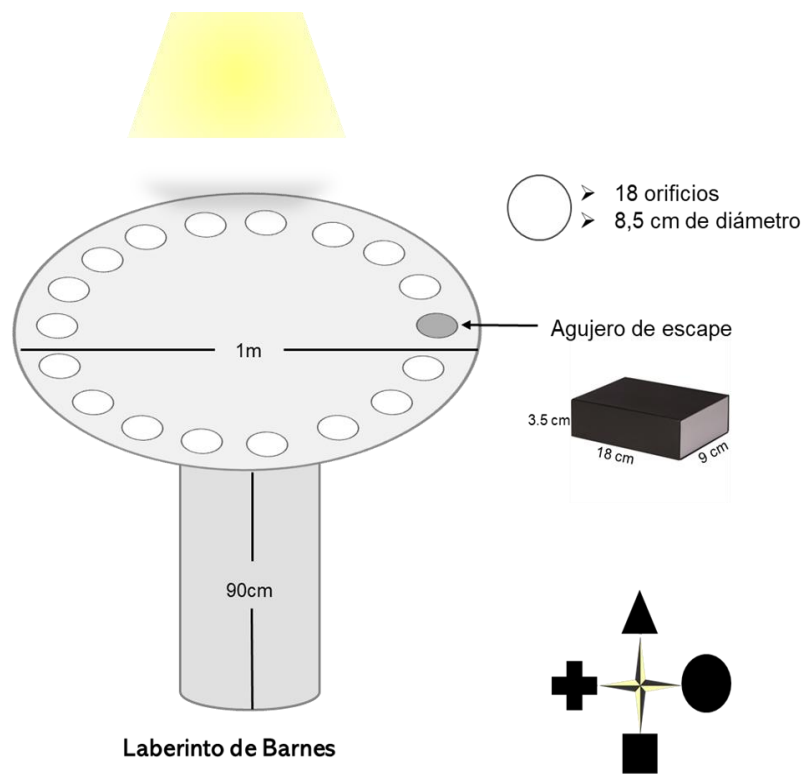


Fig. 13. Laberinto de Barnes de acrílico blanco utilizado para la prueba de aprendizaje y memoria espacial.

Entrenamiento de las ratonas en el laberinto de Barnes

Una vez que los animales llegaron al peso requerido (26-33 g) (aun sin ser aleatorizados por grupos) fueron entrenados durante tres días hasta que alcanzaron una ejecución homogénea en el LB. Treinta minutos previos a iniciar cada día de entrenamiento, las ratonas fueron colocadas en el área de habituación con la finalidad de que se adaptaran a los cambios de luz y temperatura. Una vez transcurridos los 30 minutos, se colocó a cada ratona en el centro de la plataforma bajo una caja oscura durante 5 segundos, posteriormente se retiró la caja y simultáneamente se encendió la luz, y comenzaron a transcurrir 180 segundos en el cronómetro, tiempo en el que la ratona debía explorar el laberinto hasta encontrar el agujero de escape, si era el caso de que la ratona no encontrara el agujero la experimentadora le guiaba hasta él y se le mantenía ahí por un minuto. Una vez culminado cada ensayo la ratona regresó a su caja de cautiverio durante 5 minutos para después repetir la prueba. Cada día de entrenamiento se realizaron 12 ensayos y se registraron las latencias de escape en segundos, es decir, el tiempo desde que la ratona comenzó a explorar el laberinto hasta que encontró el agujero de escape.

Prueba en el laberinto de Barnes

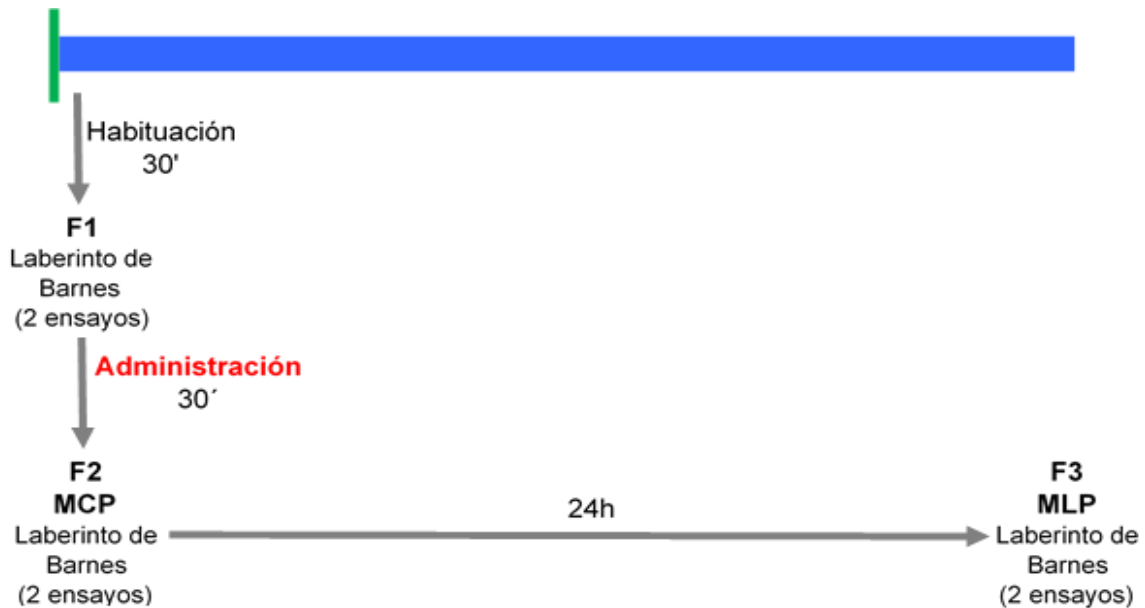
Al finalizar el tercer día de entrenamiento, las ratonas fueron aleatorizadas en los grupos previamente descritos y el cuarto día se ejecutó la prueba en el laberinto.

Después de la habituación las ratonas realizaron la prueba en el LB que constó de tres fases, la primera (F1), en la cual la ratona realizó solo dos ensayos en el LB, como recordatorio de lo aprendido en los entrenamientos; la segunda (F2) (MCP), se realizó 30 minutos posteriores a haber culminado la F1, y de igual manera se ejecutaron solo dos ensayos; la tercera (F3) (MLP), se ejecutó cumplidas las 24 horas de haber iniciado con la F1, realizando de igual manera dos ensayos en el LB. Durante los ensayos se registraron las latencias de escape en segundos.

Administración a los grupos experimentales

Fueron tres grupos, que recibieron vehículo (DMSO:PEG) o rotenona (1 mg/kg) por vía intraperitoneal.

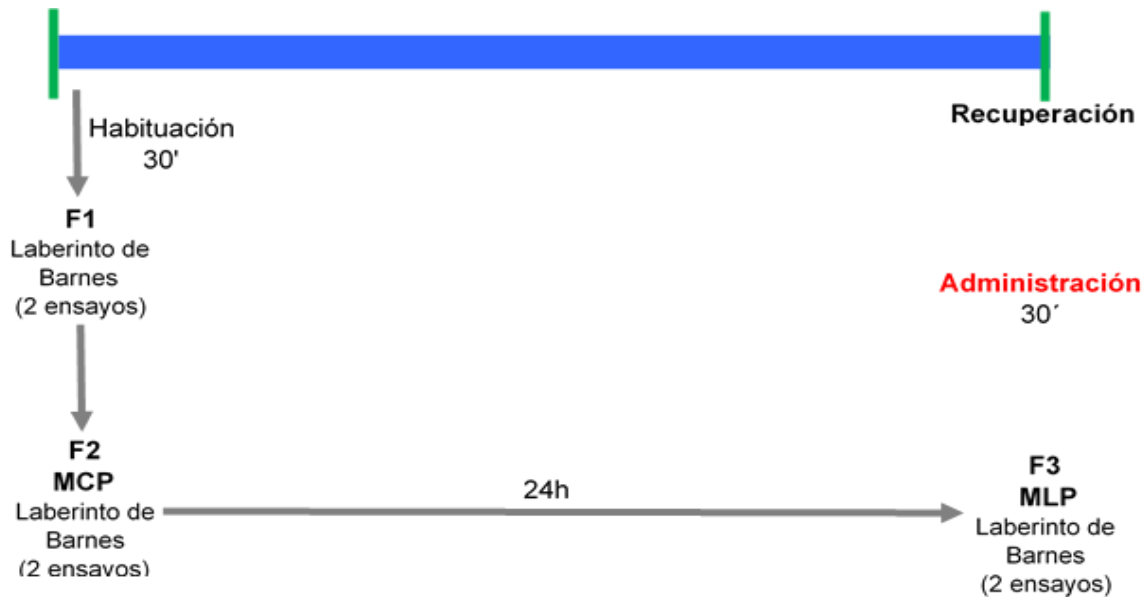
Grupo para evaluar Adquisición: La administración se realizó inmediatamente al culminar la F1.



Grupo para evaluar Consolidación: La administración se realizó 10 horas posteriores de haber iniciado con la F1.



Grupo para evaluar Recuperación: La administración se realizó 30 minutos previos a iniciar la F3.



Obtención de tejido nervioso

Al finalizar todos los grupos la F3, fueron anestesiados con pentobarbital sódico en una dosis de 60 mg/kg por vía intraperitoneal, posterior a ello fueron perfundidos con solución salina isotónica al 0.9% durante 7 minutos y después con una solución de paraformaldehído al 4% en PBS 1x (pH 7.4) durante 15 minutos.

Los cerebros obtenidos se conservaron en una solución de paraformaldehído y posteriormente se realizaron cortes coronales de 60 μm de espesor, en -1.22 mm hasta -3.08 mm de Bregma, con un micrótopo de congelación Leica modelo SM2010 R.

Técnica de inmunohistoquímica para la detección Sinaptofisina I

Los tejidos con la zona de interés fueron colocados en placas de 12 pozos para cultivos celulares de fondo plano con tapa. Se realizaron tres lavados con PBS-1X/Tritón-100X (0.2%; pH: 7.4) por 10 minutos en agitación, posteriormente se llevó

acabo el bloqueo con Suero de cabra al 5% (Vector Laboratories, Inc.) durante 1 hora en agitación, y nuevamente se realizaron tres lavados con PBS-1X/Tritón-100X (0.2%; pH: 7.4) por 10 minutos en el agitador, para después llevar a cabo la incubación del anticuerpo primario contra Syp I (Cell Signaling Technology; dilución 1:200) durante una noche a temperatura ambiente .

Posterior a la incubación del anticuerpo primario se realizaron tres lavados con PBS-1X/Tritón-100X (0.2%; pH: 7.4) por 10 minutos en el agitador, al culminar se llevó a cabo la incubación durante 1 hora en agitación del anticuerpo secundario Anti-mouse IgG (Vector Laboratories, Inc.; 1:500) para Anti-Syp,I después se volvieron a realizar tres lavados como ya se describió anteriormente. A continuación, se incubaron los tejidos en Estreptavidina (Life-Technology, Streptavidin Horseradish Peroxidasa (HRP) Conjugate, dilución 1:5000) durante 1 hora en el agitador, y posteriormente se realizaron tres lavados con PBS 1x durante 10 minutos en el agitador. El revelado se realizó con DAB (10 mg/mL) diluido en PBS-1X (pH: 7.4) y se inició la reacción añadiendo 5 μ L de H₂O₂ al 30%, y cuando ocurrió la reacción, se detuvo con PBS 1x y se realizaron tres lavados con PBS 1x durante 10 minutos en el agitador.

Finalmente, los tejidos fueron montados en portaobjetos gelatinizados al 3% y se dejaron secar durante 24 horas, posteriormente se llevaron a cabo la deshidratación de los mismos, iniciando con agua grado molecular, seguido de etanol al 70%, 96%, 100%, 100% y Xilol, cada paso se realizó por 10 minutos, y al finalizar se montaron con medio de montaje resina-xilol.

De cada tejido se tomaron fotografías de la región CA1, CA2 y GD y se analizaron por medio del software ImageJ NIH.

Análisis estadístico

Los resultados conductuales fueron evaluados por medio de la prueba no paramétrica de Friedman para determinar si existía diferencia estadística

significativa en los tiempos de latencia de los ensayos y la prueba U de Mann-Whitney para comparar los tratamientos con el uso del programa Graphpad 6.0. Para determinar si existe diferencia estadística significativa entre el % del área teñida del grupo vehículo y el grupo rotenona se empleó una prueba t de Student con una $p \leq 0.05$.

8.1 Efecto de la administración de rotenona sobre la memoria espacial evaluada en el laberinto de Barnes

En la figura 14. se muestran los resultados obtenidos durante los días de entrenamiento en el LB. Para su análisis estadístico, se empleó la prueba no paramétrica de Friedman, ya que los datos obtenidos (latencias de escape) no presentaron una distribución normal. Al realizar la prueba estadística se encontró que el valor de Friedman era mayor que el valor de P, lo que indica que al menos entre dos días hay diferencias significativas, por lo que se empleó la prueba de Wilcoxon para conocer entre que días existió diferencia. En el análisis de las latencias de escape obtenidas, se encontraron diferencias significativas entre los días de entrenamiento dos y tres, respecto al día uno.

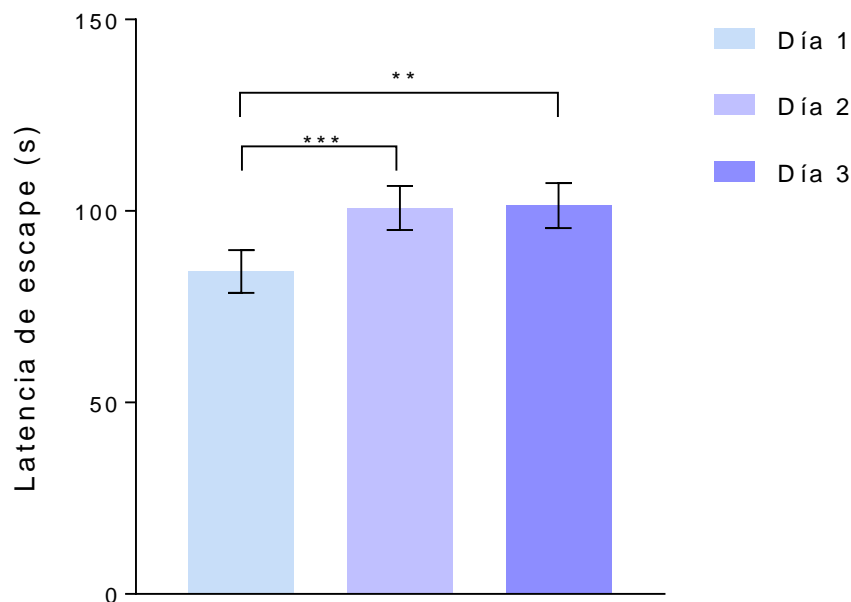


Fig. 14. Sesiones de entrenamiento en el Laberinto de Barnes. Se graficó la latencia de escape (s) para todos los sujetos experimentales y al analizar los datos por día se encontraron diferencias significativas entre los días de entrenamiento dos y tres, respecto al día uno. Wilcoxon, * $p < 0.001$ Día 2 vs Día 1, ** $p < 0.01$ Día 3 vs Día 1. Las barras muestran el promedio \pm EEM (n=42)**

8.1.1 La administración aguda de rotenona sobre el aprendizaje y la memoria espacial

Se analizaron los procesos secuenciales requeridos para la formación de una nueva memoria en una tarea espacial utilizando el LB, en los grupos adquisición (Fig. 15 A), consolidación (Fig. 15 B) y recuperación (Fig. 15 C), cada uno con su respectivo grupo Vehículo y Rotenona.

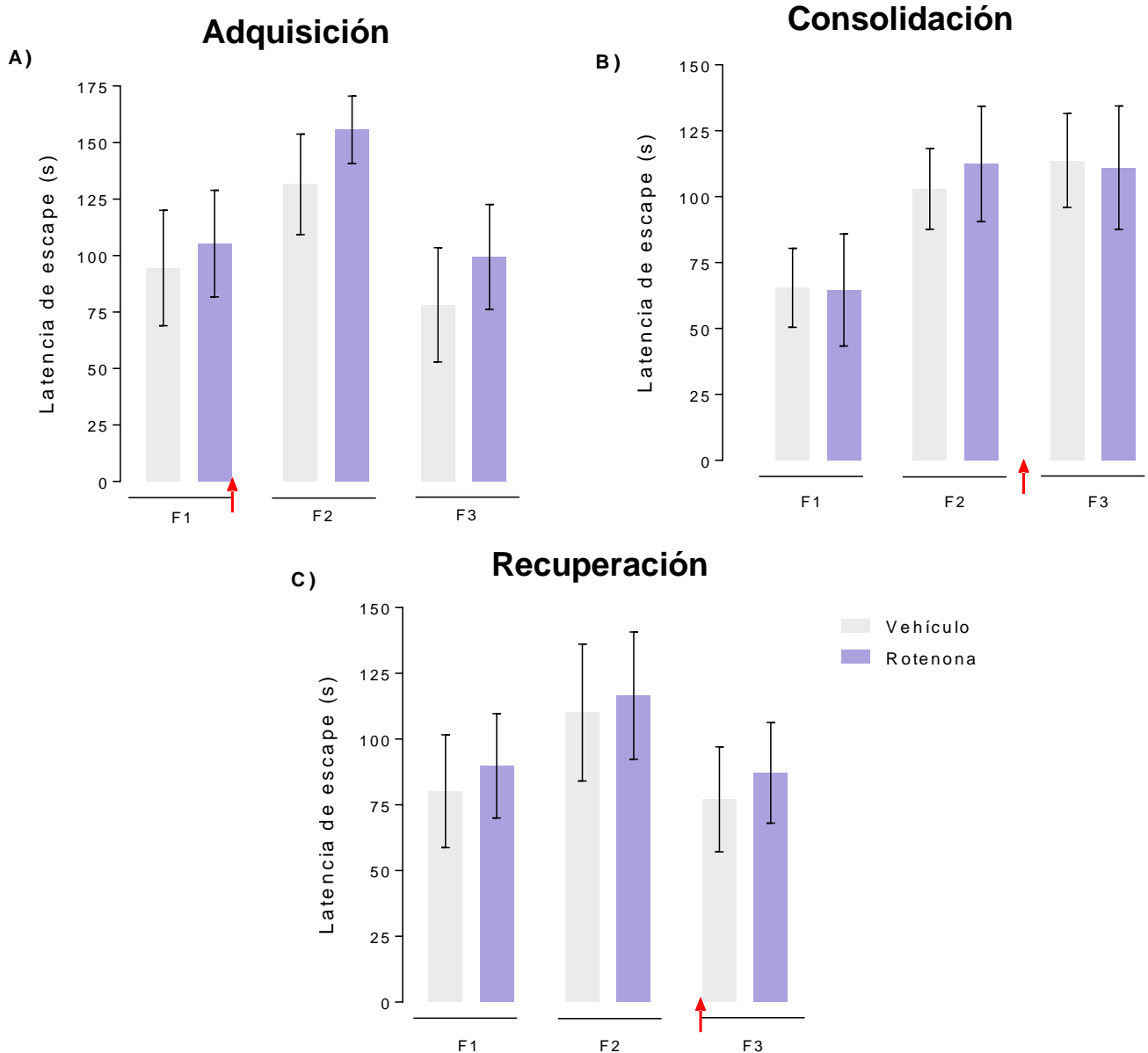


Fig. 15. Efecto de la administración aguda de rotenona sobre los grupos para evaluar adquisición, consolidación y recuperación en el laberinto de Barnes. Se graficó la latencia de escape en segundos en **A)** grupo para evaluar Adquisición, **B)** grupo para evaluar Consolidación y **C)** grupo para evaluar Recuperación, en las diferentes fases de la prueba en el LB. La flecha roja indica el momento de la administración, Vehículo o Rotenona, como correspondiera. No se encontraron diferencias significativas en la prueba de Friedman ($P > 0.05$), al igual que en la prueba U de Mann-Whitney ($p > 0.05$). Las gráficas muestran el valor de las medianas \pm EEM de cada grupo experimental ($n=7$).

Se muestra a continuación la tabla de la estadística descriptiva según las pruebas no paramétricas realizadas.

		Prueba de Friedman		Prueba U de Mann-Whitney		
		P=	Friedman	F1	F2	F3
				p=	p=	p=
Adquisición	Vehículo	0.4264	1.923	0.8345	0.3386	0.6189
	Rotenona	0.0589	5.556			
Consolidación	Vehículo	0.1916	3.714	0.6865	0.6055	0.8683
	Rotenona	0.184	4			
Recuperación	Vehículo	0.5705	1.333	0.5927	0.7698	0.8834
	Rotenona	0.5705	1.333			

Tabla 1. Estadística descriptiva de la latencia de escape realizada a los diferentes grupos en la prueba del laberinto de Barnes.

8.2 Efecto de la administración aguda de rotenona sobre la expresión de Sinaptofisina I en el hipocampo de ratona

Por medio de inmunohistoquímica por flotación con Peroxidasa/DAB, se determinó la expresión de la proteína Syp I en el hipocampo de ratona puesto que este marcador es utilizado para la detección de sinapsis, así como también, se ha relacionado con la PLP que es un proceso clave en el aprendizaje y la memoria.

Se realizó la prueba t de *Student* para comparar los grupos Vehículo y Rotenona, de cada grupo a evaluar (adquisición, consolidación, recuperación), en cada una de las regiones (CA1, CA2, CA3 y GD) con la finalidad de conocer si existía una diferencia estadísticamente significativa.

Al cuantificar el % de área teñida en la región CA1 del hipocampo (Fig. 16) se encontró un incremento estadísticamente significativo en la expresión de Syp I en el grupo Rotenona de los grupos para evaluar Adquisición y Recuperación, respecto a su grupo Vehículo.

En la región CA2 del hipocampo (Fig. 17), se encontró un incremento estadísticamente significativo de la expresión de Syp I en el grupo Rotenona de los grupos Consolidación y Recuperación respecto a su grupo Vehículo, mientras que el grupo adquisición no mostró diferencia estadísticamente significativa (Rotenona vs Vehículo).

En la región CA3 del hipocampo (Fig.18), se encontró un incremento estadísticamente significativo de la expresión de Syp I en el grupo Rotenona de los grupos Adquisición, Consolidación y Recuperación respecto a su grupo Vehículo.

En el GD (Fig. 19), se encontró un incremento estadísticamente significativo de la expresión de Syp I en el grupo Rotenona de los grupos Consolidación y Recuperación respecto a su grupo Vehículo, mientras que el grupo adquisición no mostró diferencia estadísticamente significativa (Rotenona vs Vehículo).

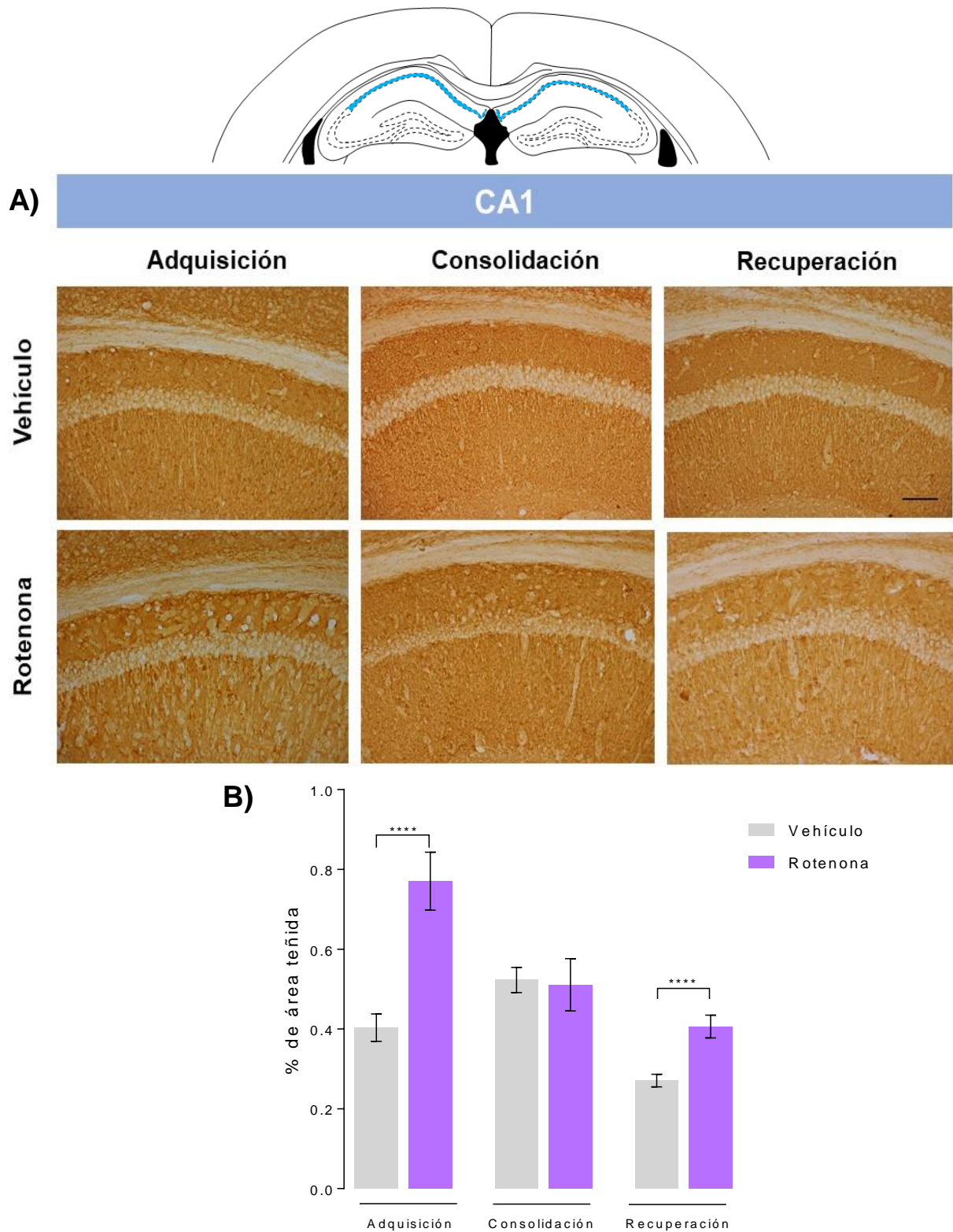


Fig. 16. La administración aguda de rotenona aumenta la expresión de Sinaptofisina I en la región CA1 del hipocampo de ratona. A) Se muestran las microfotografías representativas de la inmunohistoquímica para Syp I en la región del CA1. **B)** Marcaje cuantificado como porcentaje de área teñida en el programa Image J. La barra de calibración equivale a 100µm. Las barras muestran el valor de las medias ± EEM (n=3). Prueba t de *Student*. ****p<0.0001.

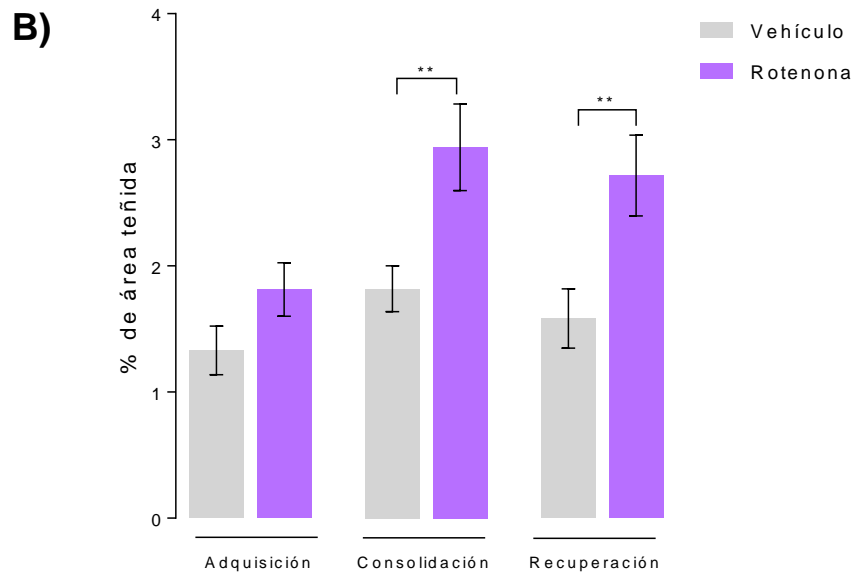
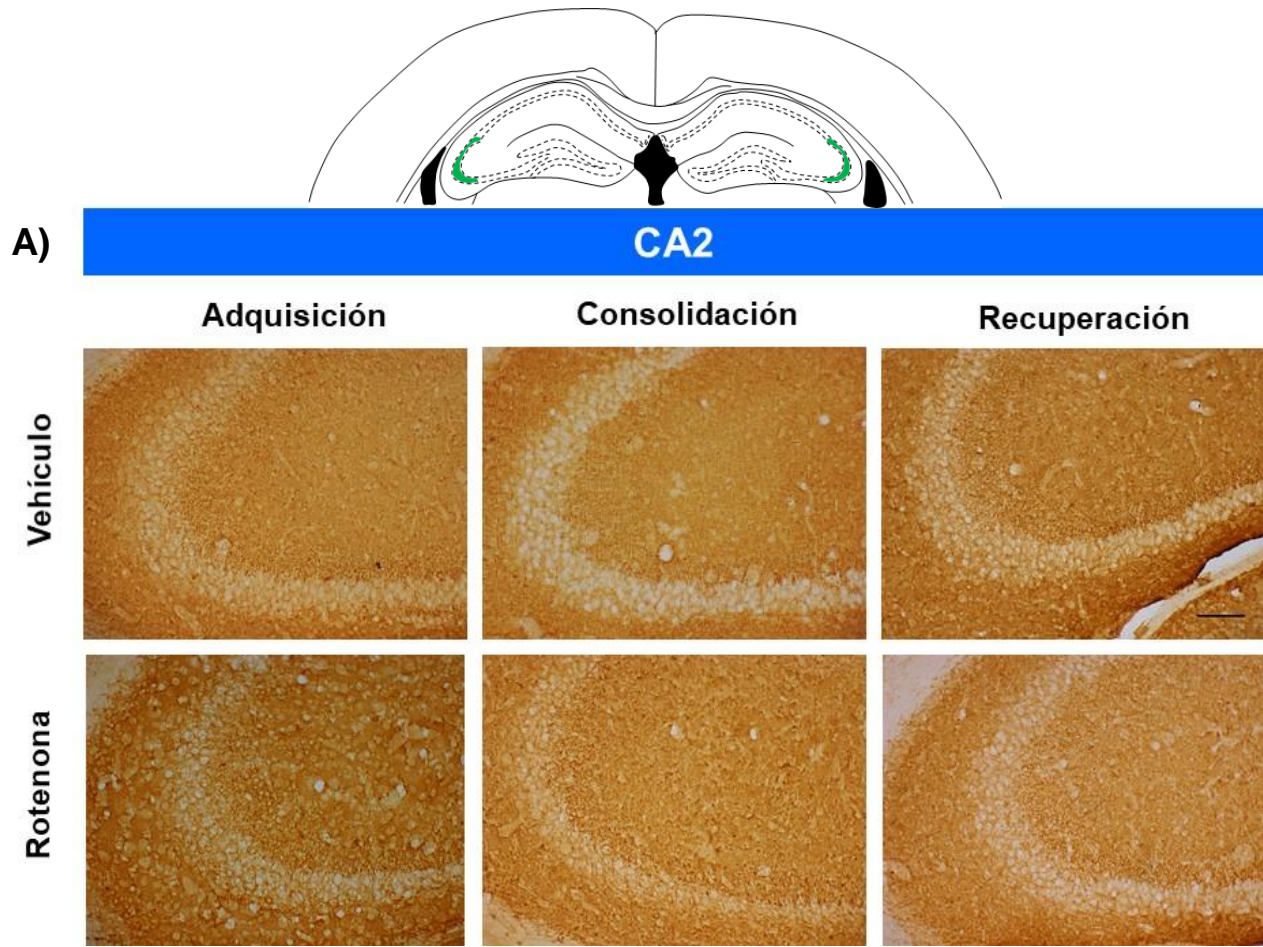


Fig. 17. La administración aguda de rotenona aumenta la expresión de Sinaptofisina I en la región CA2 del hipocampo de ratón. A) Se muestran las microfotografías representativas de la inmunohistoquímica para Syp I en la región del CA2. **B)** Marcaje cuantificado como porcentaje de área teñida en el programa Image J. La barra de calibración equivale a 100µm. Las barras muestran el valor de las medias \pm EEM (n=3). Las barras muestran el valor de las medias \pm EEM (n=3). Prueba t de Student. **p<0.01.

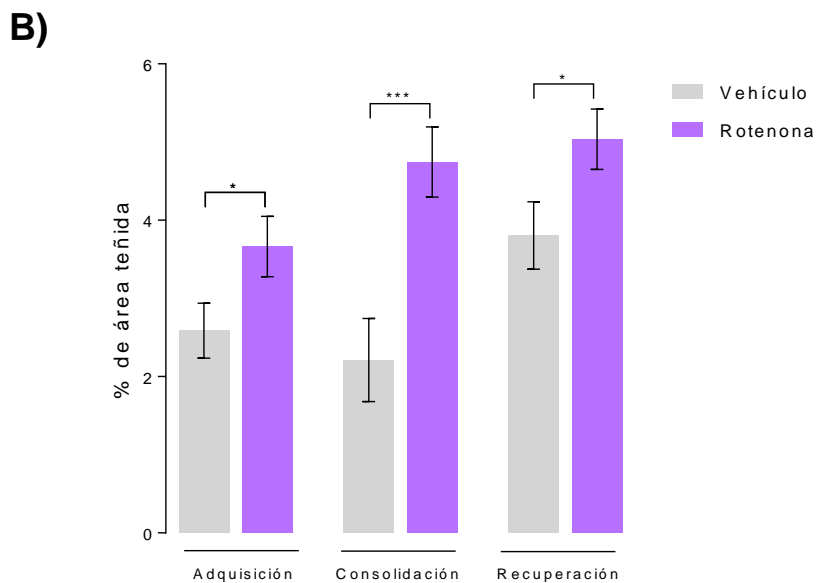
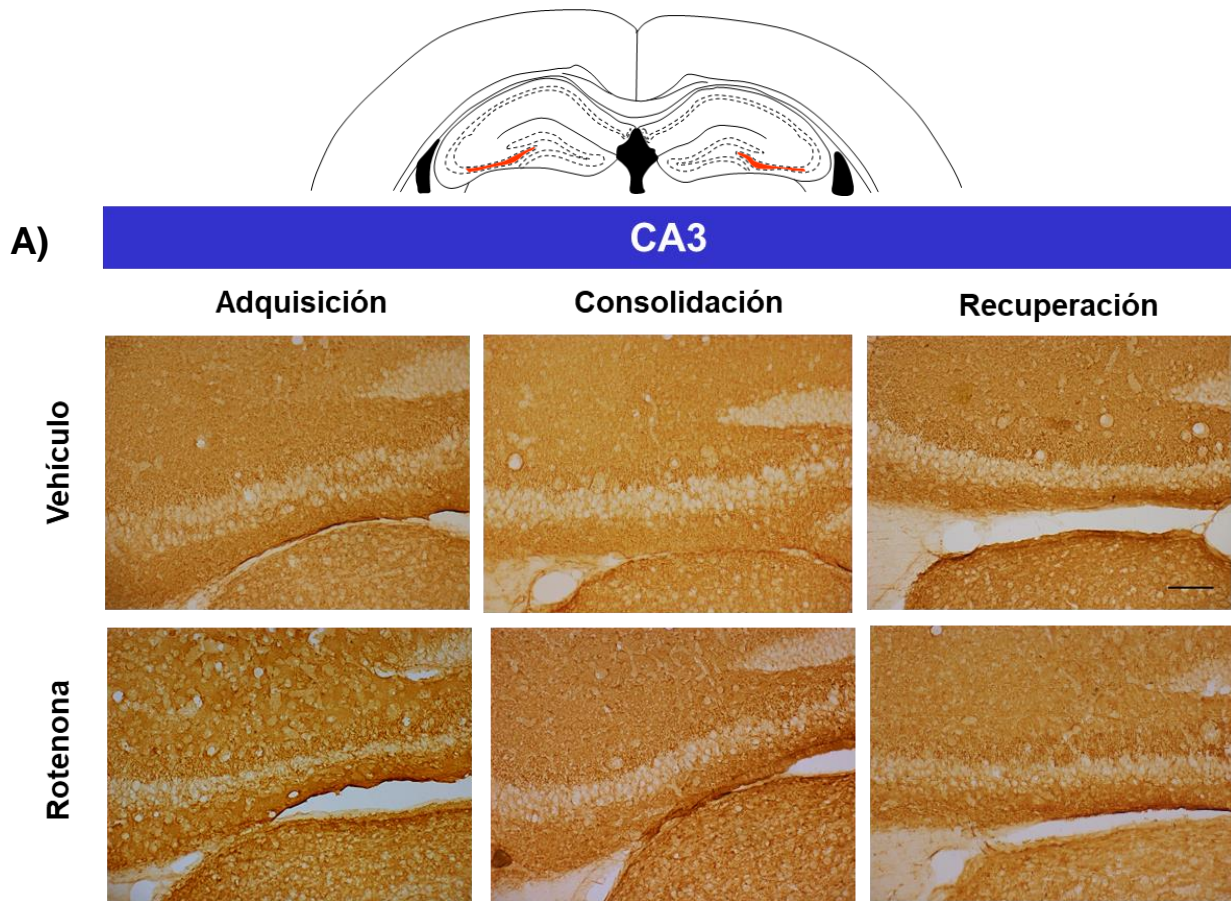


Fig. 18. La administración aguda de rotenona aumenta la expresión de Sinaptofisina I en la región CA3 del hipocampo de ratón. A) Se muestran las microfotografías representativas de la inmunohistoquímica para Syp I en la región del CA3. **B)** Marcaje cuantificado como porcentaje de área teñida en el programa Image J. La barra de calibración equivale a 100µm. Las barras muestran el valor de las medias \pm EEM (n=3). Prueba t de Student. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

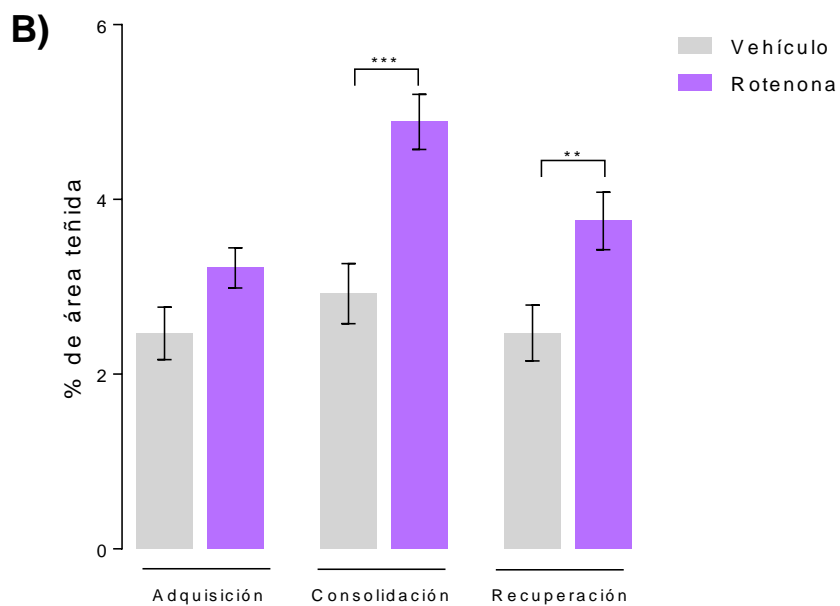
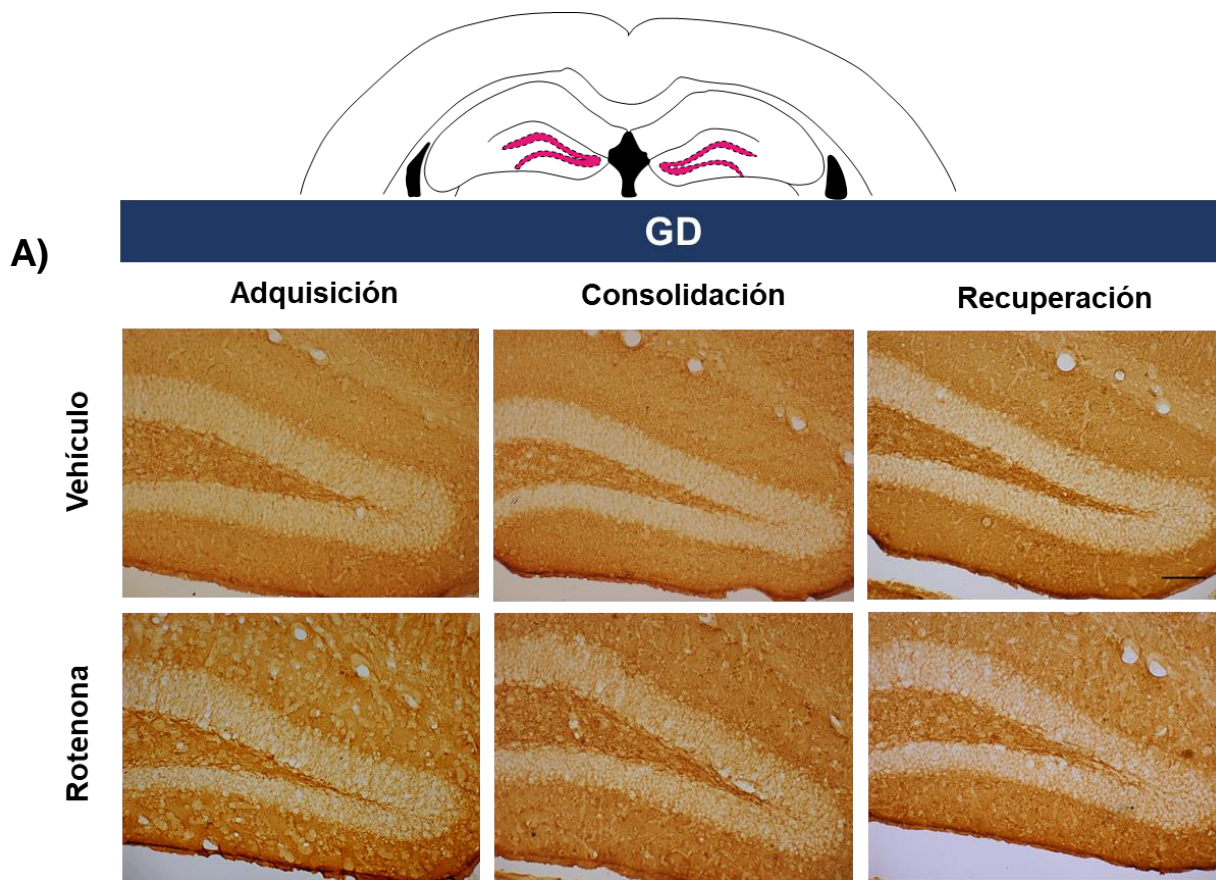


Fig. 19. La administración aguda de rotenona aumenta la expresión de Sinaptofisina I en el Giro Dentado del hipocampo de ratón. A) Se muestran las microfotografías representativas de la inmunohistoquímica para Syp I el GD. **B)** Marcaje cuantificado como porcentaje de área teñida en el programa Image J. La barra de calibración equivale a 100µm. Las barras muestran el valor de las medias ± EEM (n=3). Prueba t de *Student*. **p<0.01, ***p<0.001.

9. Discusión de Resultados

El mecanismo de acción del pesticida rotenona le ha permitido ser empleado como modelo neurotóxico (Xiong et al., 2012) al producir estrés oxidativo, muerte neuronal y en general, afectar el funcionamiento celular después de su exposición (Abdin y Hamouda, 2008; Khadrawy et al., 2017; Wang et al., 2018). Se ha estudiado el efecto adverso de su administración en diversas estructuras cerebrales como el hipocampo, el cual está involucrado en los procesos de aprendizaje y memoria espacial (Martin, Grimwood y Morris, 2000; O'Keefe y Conway, 1978). Los resultados reportan neurodegeneración en regiones hipocampales (Bhurtel et al., 2019), disminución del funcionamiento sináptico (Darbinyan et al., 2017) y defectos en la memoria espacial (Linard-Medeiros et al., 2015).

En el presente trabajo, se realizaron durante tres días consecutivos entrenamientos en el LB con el propósito de que todos los animales alcanzaran una ejecución homogénea, es decir, que conforme los días de entrenamiento avanzaran, la latencia de escape disminuyera (Attar et al., 2013; Ingersoll et al., 2018), sin embargo, en la Fig. 14 se aprecia como la latencia de escape aumentó en el día 2 y 3 respecto al día 1.

La administración aguda de rotenona (1 mg/kg) no modificó los procesos de adquisición, consolidación y recuperación en los grupos experimentales durante la prueba en el laberinto de Barnes. Cuando se compara el desempeño de las ratonas en el grupo para evaluar Adquisición en la F2 (MCP) (Fig. 15 A) no hay diferencia estadísticamente significativa entre el Vehículo y Rotenona, lo que sugiere que la administración de rotenona 30 minutos previos no afectó el proceso de adquisición de la información durante la prueba.

El mismo comportamiento se observa en el grupo Rotenona al evaluar la consolidación en la F3 (MLP) (Fig. 15 B), sugiriendo que la administración de rotenona realizada entre la F2 y la F3 no afectó los procesos de consolidación y permitió que la evocación de la información se efectuara sin cambios en la latencia de escape (F3).

Del mismo modo, no se observan diferencias estadísticamente significativas en el grupo tratado con el neurotóxico para evaluar Recuperación en la F3 (MLP) (Fig. 15 C), sugiriendo que la administración de rotenona 30 minutos previos a la recuperación de la información no produce efecto. Si bien la rotenona es un neurotóxico que puede afectar el desempeño de la memoria espacial (Linard-Medeiros et al., 2015), en el presente estudio no se observó un deterioro en la formación de la memoria espacial (Adquisición, Consolidación y Recuperación) en el LB, posiblemente esto puede deberse a la cantidad de días (3) y ensayos (12 por día) que se sometieron a las ratonas. Se ha encontrado que el aprendizaje incrementado protege a la memoria de tratamientos amnésicos (Prado-Alcalá et al., 2006), podría ser este el motivo por el cual el tratamiento con rotenona no produce deterioro en ninguna de las etapas del proceso adquisición-consolidación-recuperación. Así mismo, la retención de la memoria es muy sensible no sólo a la cantidad total de entrenamiento, sino también al patrón de ensayos utilizados durante el entrenamiento. En particular, en una variedad de tareas entre especies que van desde los invertebrados hasta los humanos, los ensayos de entrenamiento distribuidos a lo largo del tiempo (entrenamiento espaciado) conducen típicamente a una retención superior en comparación con el entrenamiento en el que los ensayos se presentan con poco o ningún descanso (Sutton, Ide, Masters, y Carew, 2002). Por otro lado, hay consenso que la formación de memorias requiere de la síntesis de proteínas que se lleva a cabo durante la potenciación a largo plazo (Asok et al., 2019).

Se ha incluido la estadística descriptiva realizada en Fig 15 A, B, y C, para observar detalladamente los resultados obtenidos a partir de las pruebas estadísticas no paramétricas aplicadas en los grupos experimentales.

Por otro lado, con la finalidad de evaluar las modificaciones sobre la sinapsis en el hipocampo que pudiera generar la Rotenona en una sola administración, determinamos Syp I. Esta es una glicoproteína transmembrana de la VS cuya ubicación en las terminales presinápticas permite su uso como marcador para cuantificación de sinapsis, así como marcador de plasticidad sináptica (Schmitt et

al., 2009). Además, es la principal fosfoproteína de tirosina en la VS (Südhof et al., 1987), propiedad que sugiere su participación en la PLP al ser fosforilada por src; lo que permite suponer que la administración de Rotenona podría tener un efecto adverso sobre la expresión de Syp I en el hipocampo de ratón (Serrano-García et al., 2018).

En el presente trabajo se determinó la expresión de Sinaptofisina I por medio de inmunoreacción empleando la técnica de peroxidasa. Los resultados hallados indican que la administración aguda de rotenona (1 mg/kg) incrementa la expresión de Syp I.

En las gráficas presentadas en las Figuras. 16, 17, 18 y 19 se presenta la cuantificación del porcentaje de área teñida para Syp I en las regiones CA1, CA2, CA3, y GD de los grupos Adquisición, Consolidación, y Recuperación (Vehículo y Rotenona, respectivamente).

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de Syp I en la región del CA1, en el grupo Rotenona de los grupos Adquisición y Recuperación respecto a su grupo Vehículo. El incremento de la expresión de Syp I no significa que no exista un daño por parte de la administración de la Rotenona, sino que puede ser el resultado de un estado compensatorio ante los efectos del neurotóxico, además, de que las células piramidales ubicadas en la región CA1 son menos resistentes a condiciones ofensivas (Alkadhi, 2019).

La expresión de Syp I en la región CA2 se destacó en el grupo Rotenona de los grupos Consolidación y Recuperación.

Respecto a CA3 la expresión de Syp I se incrementó en el grupo Rotenona de todos los grupos experimentales (Adquisición, Consolidación y Recuperación), respecto a su grupo Vehículo de igual manera, se puede deber a la administración de Rotenona, así como a la función que desempeña CA3 ya que es clave en la adquisición y consolidación de la memoria espacial, (Florian y Rouillet, 2004; Jerman, Kesner, y Hunsaker, 2006).

Respecto al GD, se incrementó la expresión de Syp I en el grupo Rotenona de los grupos Consolidación y Recuperación respecto a su grupo Vehículo. A pesar de que

las células granulares del GD son más resistentes a condiciones ofensivas (Alkadhi, 2019), Bhurtel y colaboradores (2019) reportaron un mayor daño por la exposición de Rotenona en las regiones del CA3 y GD.

Podríamos decir entonces que la administración aguda de rotenona 1 mg/kg no genera modificaciones en los procesos de adquisición, consolidación y recuperación de la información en la prueba del LB. Y que el incremento de Syp I en las regiones (CA1, CA2 y CA3) del hipocampo y GD se debe se debe a la despolimerización de microtúbulos por acción de la rotenona (Bisbal & Sanchez, 2019), ya que da como resultado la acumulación de vesículas en el soma. El aumento de la expresión de Syp I indicaría que hay una mayor acumulación de las vesículas, pero no que exista una adecuada comunicación entre las neuronas.

10. Conclusión

- La administración aguda de rotenona en dosis de 1 mg/kg no modificó la adquisición, la consolidación y la recuperación en una tarea espacial.

- La administración aguda de rotenona en dosis de 1 mg/kg incrementó la expresión de Sinaptofisina I en el hipocampo.

11. Referencias

- Abad-Rodríguez, J., & Díez-Revuelta, N. (2015). Axon glycoprotein routing in nerve polarity, function, and repair. *Trends Biochem Sci*, 40(7), 385-396. doi:10.1016/j.tibs.2015.03.015
- Abdin, A. A., & Hamouda, H. E. (2008). Mechanism of the neuroprotective role of coenzyme Q10 with or without L-dopa in rotenone-induced parkinsonism. *Neuropharmacology*, 55(8), 1340-1346. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.08.033
- Aguirre E.E (2015) La función del hipocampo en el procesamiento de la memoria y su deterioro durante el envejecimiento. *Neurociencia*. 16 (4);21-3
- Alkadhi, K. A. (2019). Cellular and Molecular Differences Between Area CA1 and the Dentate Gyrus of the Hippocampus. *Mol Neurobiol*, 56(9), 6566-6580. doi:10.1007/s12035-019-1541-2
- Asok, A., Leroy, F., Rayman, J. B., & Kandel, E. R. (2019). Molecular Mechanisms of the Memory Trace. *Trends Neurosci*, 42(1), 14-22. doi:10.1016/j.tins.2018.10.005
- Atkinson, R.C. & Shiffrin, R.M. (1968). Human memory: A proposed system and its control processes. En K.W. Spence & J.T. Spence (Eds.), *The psychology of learning and motivation: Advances in research and theory*. (Vol. 2). (pp. 742-775). New York: Academic Press
- Attar, A., Liu, T., Chan, W. T., Hayes, J., Nejad, M., Lei, K., & Bitan, G. (2013). A shortened Barnes maze protocol reveals memory deficits at 4-months of age in the triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One*, 8(11), e80355. doi:10.1371/journal.pone.0080355
- Bailey, C. H., & Chen, M. (1989). Structural plasticity at identified synapses during long-term memory in *Aplysia*. *J Neurobiol*, 20(5), 356-372. doi:10.1002/neu.480200508
- Bannerman, D. M., Sprengel, R., Sanderson, D. J., McHugh, S. B., Rawlins, J. N., Monyer, H., & Seeburg, P. H. (2014). Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. *Nat Rev Neurosci*, 15(3), 181-192. doi:10.1038/nrn3677
- Benice, T. S., Rizk, A., Kohama, S., Pfankuch, T., & Raber, J. (2006). Sex-differences in age-related cognitive decline in C57BL/6J mice associated with increased brain microtubule-associated protein 2 and synaptophysin immunoreactivity. *Neuroscience*, 137(2), 413-423. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.08.029
- Benoy, A., Dasgupta, A., & Sajikumar, S. (2018). Hippocampal area CA2: an emerging modulatory gateway in the hippocampal circuit. *Exp Brain Res*, 236(4), 919-931. doi:10.1007/s00221-018-5187-5
- Betarbet, R., Canet-Aviles, R. M., Sherer, T. B., Mastroberardino, P. G., McLendon, C., Kim, J. H., . . . Greenamyre, J. T. (2006). Intersecting pathways to neurodegeneration in Parkinson's disease: effects of the pesticide rotenone

- on DJ-1, alpha-synuclein, and the ubiquitin-proteasome system. *Neurobiol Dis*, 22(2), 404-420. doi:10.1016/j.nbd.2005.12.003
- Betarbet, R., Sherer, T. B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A. V., & Greenamyre, J. T. (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci*, 3(12), 1301-1306. doi:10.1038/81834
- Bhurtel, S., Katila, N., Srivastav, S., Neupane, S., & Choi, D. Y. (2019). Mechanistic comparison between MPTP and rotenone neurotoxicity in mice. *Neurotoxicology*, 71, 113-121. doi:10.1016/j.neuro.2018.12.009
- Bisbal, M., & Sanchez, M. (2019). Neurotoxicity of the pesticide rotenone on neuronal polarization: a mechanistic approach. *Neural Regen Res*, 14(5), 762-766. doi:10.4103/1673-5374.249847
- Brem, A. K., Ran, K., & Pascual-Leone, A. (2013). Learning and memory. *Handb Clin Neurol*, 116, 693-737. doi:10.1016/B978-0-444-53497-2.00055-3
- Cabezas, R., El-Bachá, R. S., González, J., & Barreto, G. E. (2012). Mitochondrial functions in astrocytes: neuroprotective implications from oxidative damage by rotenone. *Neurosci Res*, 74(2), 80-90. doi:10.1016/j.neures.2012.07.008
- Daly, C., & Ziff, E. B. (2002). Ca²⁺-dependent formation of a dynamin-synaptophysin complex: potential role in synaptic vesicle endocytosis. *J Biol Chem*, 277(11), 9010-9015. doi:10.1074/jbc.M110815200
- Darbinyan, L. V., Hambardzumyan, L. E., Simonyan, K. V., Chavushyan, V. A., Manukyan, L. P., & Sarkisian, V. H. (2017). Rotenone impairs hippocampal neuronal activity in a rat model of Parkinson's disease. *Pathophysiology*, 24(1), 23-30. doi:10.1016/j.pathophys.2017.01.001
- Deng, W., Aimone, J. B., & Gage, F. H. (2010). New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci*, 11(5), 339-350. doi:10.1038/nrn2822
- Diario Oficial de la Federación. Estados Unidos Mexicanos. 2001. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. NOM-062-ZOO-199. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Dos Santos, A. C., Castro, M. A., Jose, E. A., Delattre, A. M., Dombrowski, P. A., Da Cunha, C., . . . Lima, M. M. (2013). REM sleep deprivation generates cognitive and neurochemical disruptions in the intranigral rotenone model of Parkinson's disease. *J Neurosci Res*, 91(11), 1508-1516. doi:10.1002/jnr.23258
- Florian, C., & Roulet, P. (2004). Hippocampal CA3-region is crucial for acquisition and memory consolidation in Morris water maze task in mice. *Behav Brain Res*, 154(2), 365-374. doi:10.1016/j.bbr.2004.03.003
- Fykse, E. M., Takei, K., Walch-Solimena, C., Geppert, M., Jahn, R., De Camilli, P., & Südhof, T. C. (1993). Relative properties and localizations of synaptic vesicle protein isoforms: the case of the synaptophysins. *J Neurosci*, 13(11), 4997-5007.
- Gao, Y., Bezchlibnyk, Y. B., Sun, X., Wang, J. F., McEwen, B. S., & Young, L. T. (2006). Effects of restraint stress on the expression of proteins involved in

- synaptic vesicle exocytosis in the hippocampus. *Neuroscience*, 141(3), 1139-1148. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.04.066
- Hancock, D. B., Martin, E. R., Mayhew, G. M., Stajich, J. M., Jewett, R., Stacy, M. A., . . . Scott, W. K. (2008). Pesticide exposure and risk of Parkinson's disease: a family-based case-control study. *BMC Neurol*, 8, 6. doi:10.1186/1471-2377-8-6
- Harrison, F. E., Hosseini, A. H., & McDonald, M. P. (2009). Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. *Behav Brain Res*, 198(1), 247-251. doi:10.1016/j.bbr.2008.10.015
- Heikkila, R. E., Nicklas, W. J., Vyas, I., & Duvoisin, R. C. (1985). Dopaminergic toxicity of rotenone and the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion after their stereotaxic administration to rats: implication for the mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity. *Neurosci Lett*, 62(3), 389-394.
- Herring, B. E., & Nicoll, R. A. (2016). Long-Term Potentiation: From CaMKII to AMPA Receptor Trafficking. *Annu Rev Physiol*, 78, 351-365. doi:10.1146/annurev-physiol-021014-071753
- Hunsaker, M. R., & Kesner, R. P. (2018). Unfolding the cognitive map: The role of hippocampal and extra-hippocampal substrates based on a systems analysis of spatial processing. *Neurobiol Learn Mem*, 147, 90-119. doi:10.1016/j.nlm.2017.11.012
- Ingersoll, J., Moody, M., Holland, R., Kuegler, W., Murrah, C., Winslow, J., . . . Clabough, E. (2018). Analyzing Spatial Learning and Prosocial Behavior in Mice Using the Barnes Maze and Damsel-in-Distress Paradigms. *J Vis Exp*(141). doi:10.3791/58008
- Jerman, T., Kesner, R. P., & Hunsaker, M. R. (2006). Disconnection analysis of CA3 and DG in mediating encoding but not retrieval in a spatial maze learning task. *Learn Mem*, 13(4), 458-464. doi:10.1101/lm.246906
- Kalia, L. V., Gingrich, J. R., & Salter, M. W. (2004). Src in synaptic transmission and plasticity. *Oncogene*, 23(48), 8007-8016. doi:10.1038/sj.onc.1208158
- Kandel, (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*, 294(5544), 1030-1038. doi:10.1126/science.1067020
- Kandel, Dudai, Y., & Mayford, M. R. (2014). The molecular and systems biology of memory. *Cell*, 157(1), 163-186. doi:10.1016/j.cell.2014.03.001
- Kesner, R. P. (2018). An analysis of dentate gyrus function (an update). *Behav Brain Res*, 354, 84-91. doi:10.1016/j.bbr.2017.07.033
- Kesner, R. P., Taylor, J. O., Hoge, J., & Andy, F. (2015). Role of the dentate gyrus in mediating object-spatial configuration recognition. *Neurobiol Learn Mem*, 118, 42-48. doi:10.1016/j.nlm.2014.11.004
- Kessels, H. W., & Malinow, R. (2009). Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior. *Neuron*, 61(3), 340-350. doi:10.1016/j.neuron.2009.01.015
- Khadrawy, Y. A., Salem, A. M., El-Shamy, K. A., Ahmed, E. K., Fadl, N. N., & Hosny, E. N. (2017). Neuroprotective and Therapeutic Effect of Caffeine on the Rat Model of Parkinson's Disease Induced by Rotenone. *J Diet Suppl*, 14(5), 553-572. doi:10.1080/19390211.2016.1275916
- King, D. L., & Arendash, G. W. (2002). Maintained synaptophysin immunoreactivity in Tg2576 transgenic mice during aging: correlations with cognitive

- impairment. *Brain Res*, 926(1-2), 58-68. doi:10.1016/s0006-8993(01)03294-2
- Knierim, J. J. (2015). The hippocampus. *Curr Biol*, 25(23), R1116-1121. doi:10.1016/j.cub.2015.10.049
- Linard-Medeiros CF, Sales VD, Ramos AC, Sereniki A, Trevisan MT, Wanderley AG, et al. Neuroprotective effect of extract of *Anacardium occidentale* Linn on a rotenone model of Parkinson's disease. *Int J Pharm Sci Res*. 2015;6:123–9
- Marquèze-Pouey, B., Wisden, W., Malosio, M. L., & Betz, H. (1991). Differential expression of synaptophysin and synaptoporin mRNAs in the postnatal rat central nervous system. *J Neurosci*, 11(11), 3388-3397.
- Martin, S. J., Grimwood, P. D., & Morris, R. G. (2000). Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci*, 23, 649-711. doi:10.1146/annurev.neuro.23.1.649
- Martinez, T. N., & Greenamyre, J. T. (2012). Toxin models of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal*, 16(9), 920-934. doi:10.1089/ars.2011.4033
- McMahon, H. T., Bolshakov, V. Y., Janz, R., Hammer, R. E., Siegelbaum, S. A., & Südhof, T. C. (1996). Synaptophysin, a major synaptic vesicle protein, is not essential for neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(10), 4760-4764.
- Milner, B., Squire, L. R., & Kandel, E. R. (1998). Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron*, 20(3), 445-468.
- Montarolo, P. G., Goelet, P., Castellucci, V. F., Morgan, J., Kandel, E. R., & Schacher, S. (1986). A critical period for macromolecular synthesis in long-term heterosynaptic facilitation in *Aplysia*. *Science*, 234(4781), 1249-1254.
- Morellini, F. (2013). Spatial memory tasks in rodents: what do they model? *Cell Tissue Res*, 354(1), 273-286. doi:10.1007/s00441-013-1668-9
- Morgado, I. (2005). [The psychobiology of learning and memory: fundamentals and recent advances]. *Rev Neurol*, 40(5), 289-297.
- Morgado-Bernal, I. (2011). Learning and memory consolidation: linking molecular and behavioral data. *Neuroscience*, 176, 12-19. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.12.056
- Morris, R. G., Anderson, E., Lynch, G. S., & Baudry, M. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*, 319(6056), 774-776. doi:10.1038/319774a0
- Mullany, P. M., & Lynch, M. A. (1998). Evidence for a role for synaptophysin in expression of long-term potentiation in rat dentate gyrus. *Neuroreport*, 9(11), 2489-2494.
- O'Keefe, J., & Conway, D. H. (1978). Hippocampal place units in the freely moving rat: why they fire where they fire. *Exp Brain Res*, 31(4), 573-590. doi:10.1007/bf00239813
- OMS. 1988. Clasificación de pesticidas según su grado de peligro, recomendada por la OMS. y guía para su clasificación. 1988-1989. Pesticide Development and Safe Use Unit Division of Vector, Biology and control (VBC). Organización Mundial de la Salud (OMS). Ginebra. WHO/VBC/88.953

- Paul, C. M., Magda, G., & Abel, S. (2009). Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behav Brain Res*, *203*(2), 151-164. doi:10.1016/j.bbr.2009.05.022
- Pennuto, M., Dunlap, D., Contestabile, A., Benfenati, F., & Valtorta, F. (2002). Fluorescence resonance energy transfer detection of synaptophysin I and vesicle-associated membrane protein 2 interactions during exocytosis from single live synapses. *Mol Biol Cell*, *13*(8), 2706-2717. doi:10.1091/mbc.e02-01-0036
- Purcell, A. L., & Carew, T. J. (2003). Tyrosine kinases, synaptic plasticity and memory: insights from vertebrates and invertebrates. *Trends Neurosci*, *26*(11), 625-630. doi:10.1016/j.tins.2003.09.005
- Roberto A. Prado Alcalá, Guillermo Cobos Zapiaín, Rigoberto Salado Castillo, César Quiroz, María Eugenia Garín Aguilar, Arnulfo Díaz, Miguel Ángel Díaz del Guante, Andrea C. Medina, Isabel Martínez, Gina L. Quirarte. El aprendizaje incrementado protege a la memoria contratratamientos amnésicos. *Revista Mexicana de Análisis de la Conducta*. Vol. 32, número 002. pp. 203-218
- Schmitt, U., Tanimoto, N., Seeliger, M., Schaeffel, F., & Leube, R. E. (2009). Detection of behavioral alterations and learning deficits in mice lacking synaptophysin. *Neuroscience*, *162*(2), 234-243. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.04.046
- Serrano-García, N., Fernández-Valverde, F., Luis-García, E. R., Granados-Rojas, L., Juárez-Zepeda, T. E., Orozco-Suárez, S. A., . . . Jiménez-Anguiano, A. (2018). Docosahexaenoic acid protection in a rotenone induced Parkinson's model: Prevention of tubulin and synaptophysin loss, but no association with mitochondrial function. *Neurochem Int*, *121*, 26-37. doi:10.1016/j.neuint.2018.10.015
- Singer, T. P., & Ramsay, R. R. (1994). The reaction sites of rotenone and ubiquinone with mitochondrial NADH dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta*, *1187*(2), 198-202.
- Smith, T. D., Adams, M. M., Gallagher, M., Morrison, J. H., & Rapp, P. R. (2000). Circuit-specific alterations in hippocampal synaptophysin immunoreactivity predict spatial learning impairment in aged rats. *J Neurosci*, *20*(17), 6587-6593.
- Spivey, A. (2011). Rotenone and paraquat linked to Parkinson's disease: human exposure study supports years of animal studies. *Environ Health Perspect*, *119*(6), A259. doi:10.1289/ehp.119-a259a
- Squire, L. R., & Zola-Morgan, J. (1991). The cognitive neuroscience of human memory since H.M. *Annu Rev Neurosci*, *34*, 259-288. doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113720
- Strange, B. A., Witter, M. P., Lein, E. S., & Moser, E. I. (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nat Rev Neurosci*, *15*(10), 655-669. doi:10.1038/nrn3785
- Sudhof, T. C. (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci*, *27*, 509-547. doi:10.1146/annurev.neuro.26.041002.131412
- Sun, D., McGinn, M. J., Zhou, Z., Harvey, H. B., Bullock, M. R., & Colello, R. J. (2007). Anatomical integration of newly generated dentate granule neurons

- following traumatic brain injury in adult rats and its association to cognitive recovery. *Exp Neurol*, 204(1), 264-272. doi:10.1016/j.expneurol.2006.11.005
- Sun, T., Xiao, H. S., Zhou, P. B., Lu, Y. J., Bao, L., & Zhang, X. (2006). Differential expression of synaptoporin and synaptophysin in primary sensory neurons and up-regulation of synaptoporin after peripheral nerve injury. *Neuroscience*, 141(3), 1233-1245. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.05.010
- Sutton, M. A., Ide, J., Masters, S. E., & Carew, T. J. (2002). Interaction between amount and pattern of training in the induction of intermediate- and long-term memory for sensitization in aplysia. *Learn Mem*, 9(1), 29-40. doi:10.1101/lm.44802
- Südhof, T. C., Lottspeich, F., Greengard, P., Mehl, E., & Jahn, R. (1987). A synaptic vesicle protein with a novel cytoplasmic domain and four transmembrane regions. *Science*, 238(4830), 1142-1144. doi:10.1126/science.3120313
- Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E. A., Grønborg, M., Riedel, D., . . . Jahn, R. (2006). Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell*, 127(4), 831-846. doi:10.1016/j.cell.2006.10.030
- Talpade, D. J., Greene, J. G., Higgins, D. S., & Greenamyre, J. T. (2000). In vivo labeling of mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) in rat brain using [(3)H]dihydrorotenone. *J Neurochem*, 75(6), 2611-2621.
- Tolman, E. C. (1948). Cognitive maps in rats and men. *Psychol Rev*, 55(4), 189-208.
- Tsien, J. Z., Huerta, P. T., & Tonegawa, S. (1996). The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell*, 87(7), 1327-1338. doi:10.1016/s0092-8674(00)81827-9
- Tulving, E. (1972). Episodic and semantic memory. En E. Tulving & W. Donaldson (Eds.), *Organization of memory*, (pp. 381-403). New York: Academic Press.
- Valtorta, F., Pennuto, M., Bonanomi, D., & Benfenati, F. (2004). Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? *Bioessays*, 26(4), 445-453. doi:10.1002/bies.20012
- Verma, D. K., Singh, D. K., Gupta, S., Gupta, P., Singh, A., Biswas, J., & Singh, S. (2018). Minocycline diminishes the rotenone induced neurotoxicity and glial activation via suppression of apoptosis, nitrite levels and oxidative stress. *Neurotoxicology*, 65, 9-21. doi:10.1016/j.neuro.2018.01.006
- Wang, L., Fan, H., He, J., Tian, Z., & Wang, C. (2018). Protective effects of omega-3 fatty acids against Alzheimer's disease in rat brain endothelial cells. *Brain Behav*, 8(11), e01037. doi:10.1002/brb3.1037
- Wang, X., Pal, R., Chen, X. W., Limpeanchob, N., Kumar, K. N., & Michaelis, E. K. (2005). High intrinsic oxidative stress may underlie selective vulnerability of the hippocampal CA1 region. *Brain Res Mol Brain Res*, 140(1-2), 120-126. doi:10.1016/j.molbrainres.2005.07.018
- Wilde, G. J., Pringle, A. K., Wright, P., & Iannotti, F. (1997). Differential vulnerability of the CA1 and CA3 subfields of the hippocampus to superoxide and hydroxyl radicals in vitro. *J Neurochem*, 69(2), 883-886.
- Xiong, N., Long, X., Xiong, J., Jia, M., Chen, C., Huang, J., . . . Wang, T. (2012). Mitochondrial complex I inhibitor rotenone-induced toxicity and its potential mechanisms in Parkinson's disease models. *Crit Rev Toxicol*, 42(7), 613-632. doi:10.3109/10408444.2012.680431

