

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DE LA INHIBICIÓN MITOCONDRIAL DEL
ESTRIADO DORSAL EN LA CONSOLIDACIÓN DE LA
TAREA DEL LABERINTO ACUÁTICO DE MORRIS CON
CLAVE”**

TESIS COLECTIVA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTAN

OSCAR ANTONIO GUTIÉRREZ PÉREZ

MÓNICA JOSE MAYELA MONROY VALADEZ

DIRIGIDA POR

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA

CODIRIGIDA POR

Dra. GINA LORENA QUIRARTE

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2023.



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Efecto de la inhibición mitocondrial del estriado dorsal
en la consolidación de la tarea del laberinto acuático
de Morris con clave

por

Oscar Antonio Gutiérrez Pérez
Mónica Jose Mayela Monroy Valadez

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: FQLIN-240000



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

“EFECTO DE LA INHIBICIÓN MITOCONDRIAL DEL ESTRIBADO
DORSAL EN LA CONSOLIDACIÓN DE LA TAREA DEL
LABERINTO ACUÁTICO DE MORRIS CON CLAVE”

TESIS COLECTIVA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTAN

OSCAR ANTONIO GUTIÉRREZ PÉREZ
MÓNICA JOSE MAYELA MONROY VALADEZ

DIRIGIDA POR

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA

SINODALES

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA
DIRECTORA

Dra. GINA LORENA QUIRARTE
CODIRECTORA

Dr. ANTONIO FUENTES IBAÑEZ
SINODAL

M. en C. ALMA DELIA BERTADILLO JILOTE
SINODAL

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Gina Lorena Quirarte por recibirnos en su laboratorio, permitirnos realizar nuestra investigación en sus instalaciones y brindarnos su apoyo incondicional.

A la Dra. Laura Cristina Berumen Segura por su guía en lo académico y su orientación invaluable para culminar nuestra tesis.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, al Instituto de Neurobiología y a la Universidad Autónoma de México por formarnos académicamente como profesionistas e investigadores.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT; Apoyo para ayudante de investigador nivel III) y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT-UNAM (Proyecto IN209822) por los donativos que, generosamente, otorgaron.

A todos nuestros sinodales: Dra. Gina Lorena Quirarte, Dra. Laura Cristina Berumen Segura, Dr. Antonio Fuentes Ibañez y M. en C. Alma Delia Bertadillo Jilote por su corrección y refinamiento de este trabajo

Al M. en C. Rogelio Pegueros Maldonado, por incluirnos en su proyecto, así como apoyarnos en la labor intelectual y práctica de la investigación

A los integrantes del laboratorio de Aprendizaje y Memoria del Instituto de Neurobiología: M. V. Z. Norma Serafín López, Dra. Andrea C. Medina Fragoso, Dr. Roberto Agustín Prado Alcalá y el Sr. Bernardino Osorio Rojas por enriquecer nuestro trabajo en cada oportunidad.

Al M. V. Z. José Martín García Servín, la Dra. G. Alejandra Castilla León, la Dra. María Antonieta Carbajo Mata y la Lic. María Eugenia Ramos Aguilar del Laboratorio Universitario de Bioterio por proveernos nuestros sujetos experimentales y mostrarnos cómo relacionarnos con ellos de forma humana.

A la Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos de la Unidad de Microscopía por instruirnos en la forma de capturar lo minúsculo.

Al Ing. Omar González Hernández, la Ing. María Eugenia Rosas Alatorre, al Ing. Ramón Martínez Olvera y al Mtro. Moisés Mendoza Baltazar de la Unidad de Apoyo Académico en Tecnologías de la Información y Comunicación por procurar la infraestructura que sostuvo nuestra investigación.

Al Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela y la Lic. Teresa Soledad Medina Malagón de la Biblioteca del Campus Juriquilla, UNAM por facilitarnos el acceso al conocimiento académico que informó nuestro andar.

A nuestras familias

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
1. ANTECEDENTES	1
1.1. Conceptos generales de aprendizaje y memoria	1
1.1.1. Etapas de la memoria	1
1.1.2. Evaluación de la memoria.....	2
1.1.3. Sistemas de memoria	4
1.2. Estriado y aprendizaje.....	6
1.3. Mitocondria.....	10
1.3.1. Mitocondria y plasticidad neuronal.....	12
1.3.2. Actividad mitocondrial y memoria	14
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. General	17
2.2. Específicos	17
3. METODOLOGÍA.....	18
3.1. Materiales.....	18
3.1.1. Reactivos	18
3.2. Método	20
3.2.1. Sujetos.....	20
3.2.2. Manipulación.....	20
3.2.3. Cirugía estereotáxica	21
3.2.4. Entrenamiento	21
3.2.5. Prueba de retención.....	22
3.2.6. Preparación de fármacos y administración	22
3.2.7. Procesamiento de tejido	23

3.2.8. Preparación de gel de poliacrilamida	24
3.2.9. Western blot.....	24
3.2.10. Análisis de actividad mitocondrial	25
3.2.11. Microscopía confocal y análisis de imágenes	25
3.2.12. Desecho de residuos peligrosos	26
3.2.13. Análisis estadístico	26
3.3. Diseño experimental.....	27
4. RESULTADOS	29
4.1. Análisis histológico	29
4.2. Efecto de la inhibición de la actividad mitocondrial del estriado dorsal durante la consolidación.....	29
4.3. Presencia de Arc en el estriado dorsal durante la prueba de retención	32
4.4. Análisis de la acción conjunta de la actividad mitocondrial y los receptores de glucocorticoides.....	33
4.5. Análisis del potencial de membrana mitocondrial en presencia de rotenona	36
5. DISCUSIÓN.....	38
6. CONCLUSIONES	44
7. BIBLIOGRAFÍA.....	45

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1	Diseño de grupos conductuales experimento 1 27
2	Diseño de grupos conductuales experimento 2 28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Organización anatómica de los sistemas de memoria.....	6
2	Diagrama de posicionamiento de puntas de microinyector.....	29
3	Entrenamiento experimento 1.....	30
4	Prueba de retención experimento 1.....	31
5	Ensayos 1-4 de retención experimento 1.....	32
6	Densitometría de Arc en estriado.....	33
7	Entrenamiento experimento 2.....	34
8	Prueba de retención de experimento 2.....	35
9	Ensayos 1-4 de retención experimento 2.....	36
10	Análisis de actividad mitocondrial en el DS.....	37

RESUMEN

El estriado dorsal (DS) es una estructura clave en la memoria de procedimiento. La consolidación es metabólicamente demandante, pero necesaria para la estabilización de la memoria. La mitocondria es la fuente de energía principal en las neuronas y su inhibición tiene efectos negativos en la plasticidad neuronal. Por lo tanto, se propuso que la inhibición mitocondrial en el DS durante la consolidación de una tarea de procedimiento perjudicaría su retención. Ratas Wistar (machos, 250-300 g) con cánulas implantadas en el DS se entrenaron en la tarea del laberinto acuático de Morris con clave e inmediatamente después se les administró bilateralmente 0.5 μL de rotenona (0.8 o 1.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), un inhibidor del complejo I mitocondrial, o vehículo. Se realizó una prueba de retención de la tarea 48 horas después. Se analizó la presencia de la proteína Arc, marcador de actividad neuronal, en los DS de los sujetos mediante western blot. Se exploró la interacción entre el receptor de glucocorticoides y la rotenona durante la consolidación de la misma tarea administrando secuencialmente, en el DS, 0.5 μL de RU-486 (10 $\text{ng}/\mu\text{L}$) y rotenona (0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Paralelamente, se analizó la inhibición mitocondrial en cortes de estriado tratados con rotenona (500 nM) mediante tinción fluorescente. Se determinó que la administración de rotenona disminuyó el potencial de membrana mitocondrial, que la inhibición del complejo I mitocondrial en el DS facilitó la consolidación de la tarea de procedimiento, que esta facilitación no indujo cambios en la expresión de Arc durante la evocación de la tarea y que el efecto facilitador de la rotenona no parece estar mediado por el receptor de glucocorticoides.

1. ANTECEDENTES

1.1. Conceptos generales de aprendizaje y memoria

En neurociencia, el aprendizaje puede definirse operacionalmente como un cambio conductual derivado de la experiencia. En este sentido, la memoria se entiende como la conservación del aprendizaje para su uso en el futuro (Josselyn y Tonegawa, 2020). El desarrollo de la memoria se suele conceptualizar como un fenómeno multifacético que comprende tres etapas: codificación, consolidación y evocación (Asok y col., 2019). Este proceso requiere de alteraciones duraderas, físicas y químicas, del sistema nervioso (Dudai y Morris, 2013; Okano y col., 2000). Al cúmulo de cambios provocados por el aprendizaje se le denomina engrama, el cual es la unidad básica de la memoria y uno de los objetos de estudio principales en la neurobiología de la memoria (Ryan y Frankland, 2022).

1.1.1. Etapas de la memoria

La codificación es el primer paso en la formación de la memoria, consiste en la transformación de los estímulos ambientales a una forma que puede ser procesada por el cerebro. La biofísica de esta etapa es un tema de discusión actual (Tonegawa y col., 2015, 2018), pero se puede decir que la codificación implica la excitación de redes neuronales que interpretan la información sensorial y la proyectan hacia diversas regiones cerebrales que la almacenan simultáneamente (Berger y col., 2012; Guskjolen y Cembrowski, 2023).

La memoria recientemente codificada, llamada de corto plazo, es temporal, lábil, altamente sensible a interferencias y de decaimiento rápido (Nader y col., 2000). Para que el engrama perdure, este debe someterse a un proceso cognitivo de estabilización denominado consolidación (Alberini y col., 2006; Dudai, 2012). Se reconocen dos tipos de consolidación: sináptica y sistémica. La consolidación sináptica comprende cambios en el circuito neuronal focalizados en la sinapsis y los nodos celulares (Dudai y col., 2015). Dentro de las primeras horas posteriores a un estímulo, se activan diferentes cascadas de señalización que provocan

modificaciones postraduccionales, cambios en la expresión génica y la síntesis proteica que alteran la plasticidad sináptica (Takehara-Nishiuchi, 2021). La consolidación sistémica, por su parte, es un proceso de mayor duración que puede requerir de semanas o meses, dependiendo de la especie, el sistema de memoria y la tarea (Dudai y col., 2015). En ella, la estructura principal de almacenamiento cambia a fin de estabilizar la memoria (Sehgal y col., 2013). Este fenómeno se ha observado experimentalmente en hipocampo, quien cede preeminencia al sistema neocortical en el alojamiento de memoria hasta que la información se vuelve mayormente independiente de hipocampo (Squire y col., 2015; Sutherland y McNaughton, 2000). Aquella memoria que es sometida al proceso de consolidación es considerada de largo plazo, es decir, información que perdura en el tiempo y es menos susceptible a alteraciones (Alberini y col., 2006; Dudai y Morris, 2000).

El proceso de consolidación puede ser intervenido por diversos factores como: trauma cerebral, choques electroconvulsivos, inhibidores de la síntesis proteica y varios fármacos (Alberini, 2005), por lo que se ha vuelto un punto de interés para el análisis de la formación de memoria. Se han desarrollado múltiples tratamientos conductuales y farmacológicos que se administran durante el periodo crítico de consolidación para facilitar o deteriorar este proceso (McGaugh, 2000).

Una memoria consolidada puede ser accedida mediante la evocación, la cual ocurre mediante la interacción de estímulos internos, estímulos externos y el engrama. En otras palabras, la evocación puede entenderse como la expresión conductual del engrama inducida por estímulos, los cuales pueden ser producidos por voluntad o espontáneamente (Frankland y col., 2019).

1.1.2. Evaluación de la memoria

La formación del engrama puede valorarse desde diferentes ángulos. El acercamiento conductual clásico consiste en la evaluación de los sujetos en un tiempo determinado después de su entrenamiento en una tarea, en donde se correlaciona el desempeño con la calidad de adquisición o consolidación del

aprendizaje (Amin y Malik, 2013; Dudai, 2004). El advenimiento de nuevas técnicas experimentales ha permitido el análisis de la formación de la memoria desde perspectivas celulares y moleculares. Estudios *in vivo* e *in vitro* han mostrado que, minutos después de la estimulación neuronal, se activa la transcripción de un grupo de genes, denominado genes de expresión temprana (IEG, por sus siglas en inglés), que regulan la síntesis de proteínas y la transcripción de genes secundarios, clave para la formación de la memoria (Minatohara y col., 2016). Se ha vinculado la expresión diferencial de IEGs en regiones específicas del cerebro con el desempeño de diversas tareas conductuales como el laberinto acuático de Morris (MWM, por sus siglas en inglés) y el condicionamiento de miedo al contexto, (Mamiya y col., 2009), por lo que son comúnmente utilizados como marcadores de actividad neuronal (Chia y Otto, 2013).

El gen de la proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad (Arc) es un IEG esencial para la adquisición y la consolidación de memoria (Epstein y Finkbeiner, 2018), su expresión es dinámica, incrementando y decayendo rápidamente después de instantes de actividad neuronal elevada o la exposición a un estímulo novedoso, de tal modo que su mayor actividad se encuentra durante la primera hora de su estimulación (Das y col., 2023; Wall y col., 2018). La expresión de Arc se ha vinculado con la potenciación a largo plazo de sinapsis en cultivos celulares, donde se ha observado que su síntesis es necesaria para el fortalecimiento de conexiones neuronales (Messaoudi y col., 2007). Asimismo, estudios *in vivo* han mostrado que la expresión de Arc es esencial para la formación de memorias a largo plazo (Plath y col., 2006) y que afecciones bioquímicas como el desacoplamiento mitocondrial en neuronas corticales tiene efectos en los niveles de síntesis de la proteína y en la formación de la memoria (Liu y col., 2015) Generalmente, se ha asociado a la expresión de Arc con etapas tempranas de aprendizaje (Guzowski y col., 2000; Ploski y col., 2008), sin embargo, se ha observado que presenta un patrón de expresión similar durante la evocación (Nakayama y col., 2015; Ramírez-Amaya y col., 2005).

1.1.3. Sistemas de memoria

La memoria es un proceso cognitivo vasto, que comprende toda la información que se almacena en el cerebro, por este motivo, se han desarrollado diferentes maneras de clasificarla (Reber, 2013). El sistema de organización mejor estudiado es el derivado de las observaciones del paciente H.M., a quien se le practicó una lobectomía bitemporal (Scoville y Milner, 1957). El paciente H.M. era capaz de desempeñar habilidades mecánicas, pero incapaz de recordar eventos previos a la cirugía y de consolidar nueva información a largo plazo. La pérdida selectiva de facultades hizo notar la disgregación de la memoria en diferentes sistemas fisiológicos (Squire y Zola-Morgan, 2015). Este suceso impulsó el desarrollo de investigaciones en modelos animales, como los experimentos de doble disociación, en los que dos áreas del cerebro se analizaban simultáneamente (Ferbinteanu, 2019). Estos estudios mostraron que las lesiones del lóbulo temporal medial (MTL, por sus siglas en inglés) causaban una pérdida selectiva de la capacidad de consolidar memorias nuevas sobre hechos y eventos (Mayford y col., 2012). Al mismo tiempo, se encontró que existía otro tipo de memoria que no era afectada por daños al MTL, la memoria implícita o de procedimiento, que se adquiría fuera de la conciencia (Reber, 2008). La organización taxonómica de la memoria se realizó con relación al MTL, aquella que dependía principalmente de esta estructura se denominó declarativa, mientras que aquella que no lo era, se llamó no declarativa (Squire, 2004).

El MTL se compone por el hipocampo y las áreas corticales circundantes. Estas estructuras se encuentran organizadas jerárquicamente, de tal manera que las áreas corticales codifican la información proveniente de los estímulos ambientales y el hipocampo forma asociaciones entre ellos (Squire y Zola-Morgan, 2015). Esta relación puede observarse en el caso de las células de lugar en hipocampo, las cuales procesan la información sensorial proveniente de la corteza (O'Keefe y Dostrovsky, 1971) para producir un mapa cognitivo del entorno que permite al sujeto navegar el ambiente (O'Keefe y Nadel, 1979).

La memoria no declarativa es un término general que comprende un grupo heterogéneo de capacidades como: habilidades motoras, imprimación, hábitos, sensibilización y habituación, por lo que no depende de un único sistema cohesivo de memoria (Henke, 2010). Se piensa que la información se almacena en las regiones asociadas con el procesamiento de estímulos o la producción de respuestas, lo que causa que este tipo de memoria opere fuera de la consciencia (Reber, 2013). Las principales estructuras asociadas con la memoria no declarativa son el estriado (parte de los ganglios basales), el cerebelo y la neocorteza (Batterink y col., 2019). La repetición es clave para el desarrollo de esta memoria, como se observó en estudios de aprendizaje motor, en donde la reiteración de la tarea causó un incremento en actividad de la corteza motora, los ganglios basales y el cerebelo, que, a su vez, se correlacionó con un mejor desempeño (Reber, 2013). Se ha sugerido la existencia de dos subsistemas en la memoria no declarativa, el corticoestriatal y el corticocerebeloso, que actúan en conjunto en un inicio, pero se disocian durante la automatización de la respuesta, predominando el sistema corticoestriatal (Doyon, 2008).

Los sistemas de memoria operan de manera independiente y paralela para almacenar información y modular la conducta. La forma en la que trabajan en conjunto sigue siendo investigada (Squire y Zola-Morgan, 2015), pero son capaces de cooperar y competir entre sí durante la formación de la memoria, existiendo tareas en las que es indispensable la participación de ambos (Albouy y col., 2013).

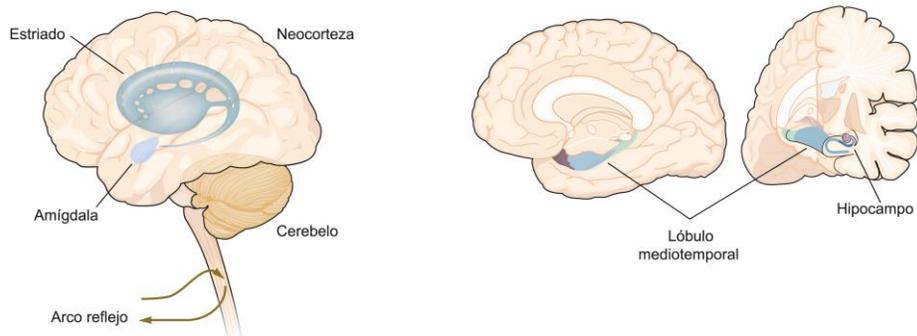
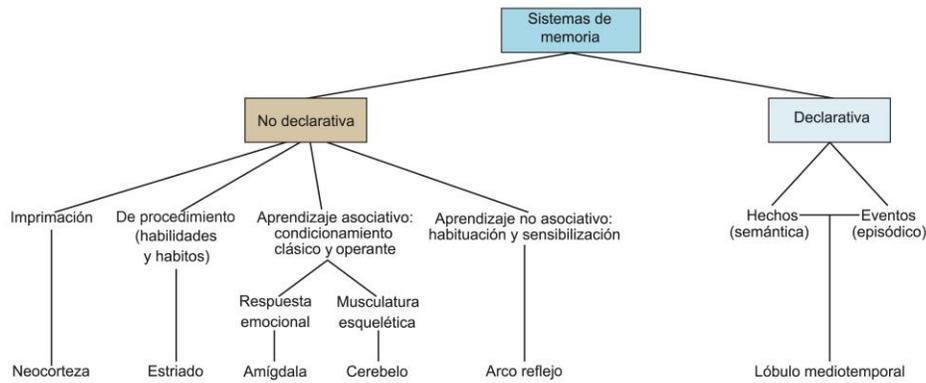


Figura 1. Organización anatómica de los sistemas de memoria. Modificado de Kandel y col. (2021).

1.2. Estriado y aprendizaje

Se ha encontrado que el estriado juega un papel central en la entrada de información a los ganglios basales, ya que procesa e integra estímulos provenientes de las cortezas cerebrales y los dirige hacia regiones talámicas para el control de la ejecución motora (Bosch-Bouju y col., 2013). Particularmente, se ha demostrado que el estriado dorsal (DS, por sus siglas en inglés) participa en el aprendizaje y ejecución de habilidades motoras (Willuhn y Steiner, 2009; Yin y col., 2009).

El estriado se ha vinculado con el aprendizaje asociativo, el cual relaciona estímulos, acciones y recompensas para provocar un comportamiento (Liljeholm y O'Doherty, 2012). Este se divide en condicionamiento clásico y operante. El clásico o pavloviano, asocia un estímulo neutro con una respuesta incondicionada (conducta producida comúnmente por un estímulo incondicionado) para convertirla en una respuesta

condicionada. Al condicionarse, el estímulo neutro se convierte en un estímulo condicionado (O'Doherty y col., 2017). Ejemplos de este tipo de condicionamiento son las tareas de condicionamiento de miedo al contexto y al tono, donde se asocia un choque eléctrico con un contexto, luz o tono. Posteriormente, el contexto o el estímulo, ahora condicionado, generan una respuesta condicionada, en este caso la conducta de congelamiento (Izquierdo y col., 2016). El condicionamiento operante o instrumental, vincula la conducta con sus consecuencias mediante su asociación con un reforzador, positivo o negativo que incrementa la probabilidad de la conducta, o un castigo, que disminuye la probabilidad de ocurrencia (Babel, 2020). Ejemplos de este tipo de condicionamiento son las tareas de rotarod, el MWM y el laberinto de Tolman (Innos y Hickey, 2021; Izquierdo y col., 2006; Siller-Pérez y col., 2017;). En este último, se asocia el giro hacia una dirección predeterminada para alcanzar un reforzador apetitivo, aumentado así, gradualmente, la conducta de giro (Fuentes-Ibañez y col., 2021).

El condicionamiento operante se subdivide en aprendizaje dirigido a objetivos y aprendizaje del hábito. Cuando una acción tiene un propósito concreto y el resultado es positivo, este comportamiento tiende a repetirse, denominándose aprendizaje dirigido a objetivos (Kreitzer y Malenka, 2008). Gradualmente, se adquiere la asociación estímulo-respuesta y el reforzamiento constante por medio de la práctica provoca que se convierta en un hábito: secuencias motoras inflexibles motivadas por un estímulo, que pueden ejecutarse inconscientemente disminuyendo el esfuerzo cognitivo del organismo (Gasbarri y col., 2014).

Lesiones en los ganglios basales, principalmente en el estriado, irrumpen el desempeño del aprendizaje operante, aunque las capacidades motoras parecen no resultar afectadas, la adquisición de tareas sí lo es (Peak y col., 2019; Yin y Knowlton, 2006). McDonald y White (1993) realizaron un experimento de triple disociación y atribuyeron a la amígdala, el hipocampo y el estriado, la adquisición de diferentes tipos de información. La lesión electrolítica o neurotóxica del DS deterioro la

adquisición de la tarea de premio fijo, una actividad dependiente de la asociación estímulo-respuesta.

Al igual que las lesiones, la intervención farmacológica del DS se ha implementado para irrumpir durante la formación de memorias operantes (Gardner y col., 2020). La manipulación con glutamato del hipocampo y el estriado se probó para observar la acción simultánea y competitiva de los sistemas de memoria (Packard, 1999). Packard (1999) utilizó la tarea de laberinto en cruz conocida por su funcionalidad para evaluar el uso de aprendizajes dependientes de lugar, característico principalmente al comienzo del entrenamiento, o de respuesta, dominante en la etapa tardía. La administración de glutamato en el estriado provocó una aparición temprana del aprendizaje de respuesta y se mantuvo dominante hasta la conclusión del entrenamiento. Por el contrario, la manipulación del hipocampo produjo un efecto antagónico.

Una de las tareas más utilizadas durante los primeros años de estudio, y hasta la actualidad, es el MWM (Izquierdo y col., 2006; Othman y col., 2022), que permite estudiar la memoria implícita y explícita (Izquierdo y col., 2006). La tarea del MWM se realiza en un contexto aversivo para los sujetos, por lo que se detonan mecanismos endógenos motivados por estrés, modulados por catecolaminas y glucocorticoides, corticosterona en roedores (Roosendaal y McGaugh, 2011; Sandi, 2003).

Los glucocorticoides son producidos por el sistema de estrés eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Chrousos, 2009) y secretados siguiendo el ciclo circadiano en animales diurno (Shirazi y col., 2015) con una regulación opuesta en animales nocturnos (Chung y col., 2011). Al ser moléculas liposolubles, atraviesan la barrera cerebral, se unen a receptores específicos, mineralocorticoides o glucocorticoides, se translocan al núcleo y estimulan o reprimen la expresión de genes (Meijer y col., 2018) para modular la codificación y la formación de memorias a largo plazo (Klier y Buratto, 2020). Se ha observado que su efecto en la memoria es dependiente de la etapa de la memoria, la dosis y el tiempo de exposición (Quirarte y col., 2009;

Schwabe y col., 2022) y que, a su vez, puede ser revertido por antagonistas del receptor de glucocorticoides, como el RU-486 (de Kloet y col., 2018; Medina y col., 2007).

McDonald y White (1994) estudiaron la memoria entrenando animales en dos versiones de la tarea del MWM, una versión con resolución espacial, vinculada al fórnix, y otra versión con resolución procedimental, vinculada al DS. Al dañar el DS de los roedores observaron que estos utilizaban predominantemente una resolución espacial. Mientras que al lesionar el fórnix se desarrollaba una estrategia procedimental, demostrando la necesidad de un estriado intacto para desarrollar esta estrategia.

El estriado se divide anatómicamente en ventral y dorsal. Se ha observado que estas áreas colaboran en la dirección de diferentes comportamientos (Haber, 2016). El estriado ventral está conformado por el núcleo accumbens, una porción estriada del tubérculo olfatorio y la extensión ventromedial del núcleo caudado y el putamen. El DS se compone del núcleo caudado y el putamen, separados por la cápsula interna, en primates, mientras que, en los roedores, no existe esta división denominándose comúnmente complejo caudado-putamen (Gonzales y Smith, 2015).

El DS es funcionalmente heterogéneo, se encuentra segmentado en medial y lateral. El estriado dorsomedial se asocia con el aprendizaje dirigido a objetivos, mientras que el estriado dorsolateral se vincula con el aprendizaje del hábito (Goodman y Packard, 2018). Este hecho se ha comprobado por medio de lesión o inactivación del estriado dorsomedial, observándose una deficiencia en la adquisición del aprendizaje dirigido a objetivos, compensada con la formación del hábito (Yin y col., 2005). De la misma manera, la manipulación del estriado dorsolateral previene la ejecución de hábitos, prevaleciendo el aprendizaje dirigido a objetivos aún después de un entrenamiento prolongado (Malvaez y Wassum, 2018). Esta diferencia de funcionalidad es atribuida a la diferente recepción de proyecciones de regiones corticales y subcorticales. El estriado dorsolateral recibe información de la corteza motora y de la región somatosensorial. El estriado dorsomedial percibe datos de las

áreas corticales frontales asociativas, como la corteza orbitofrontal (Lipton y col., 2019).

Para establecer comunicación con otras estructuras cerebrales el estriado contiene neuronas de proyección. Las neuronas espinosas medianas abarcan entre el 90 y 95 % del total de neuronas, utilizan el ácido gamma-aminobutírico (GABA, por sus siglas en inglés) como su principal neurotransmisor y se subdividen en dos grandes grupos (Bolam y col., 2000). Las neuronas espinosas medianas nigroestriatales se caracterizan por su alta expresión de receptores dopamina D1 y muscarínicos M4, se proyectan al globo pálido interno y la sustancia negra pars reticulata. En contraste, las neuronas espinosas medianas estriatopalidales, expresan receptores dopamina D2 y adenosina A2A, y trazan su actividad hacia el globo pálido externo (Kreitzer y Malenka, 2008).

En un grupo más reducido de células características del estriado se encuentran las interneuronas, las cuales se clasifican en colinérgicas y GABAérgicas, distinguiéndose entre sí por su diferente expresión de enzimas y neuropéptidos. Estas reciben aferencias de la corteza cerebral, el tálamo y el tronco encefálico (Basile y col., 2021).

1.3. Mitocondria

La mitocondria es un organelo altamente especializado cuya función principal es la producción de energía (Padamsey y Rochefort, 2023), se conforma por dos membranas, las cuales delimitan cuatro componentes distintos, la membrana externa, el espacio intermembranal, la membrana interna y la matriz (McBride y col., 2006). La membrana interna se encuentra doblada en forma de crestas, las cuales contienen la maquinaria molecular necesaria para acoplar la síntesis de ATP a la fosforilación oxidativa, (OXPHOS, por su nombre en inglés) mediante la generación de un gradiente de protones a través de la cadena de transporte de electrones (López-Doménech y Kittler, 2023). Se estima que la OXPHOS es responsable de alrededor de 30 de las 32 moléculas de ATP generadas por cada ciclo de glicólisis

(Zielke y col., 2009), por lo que es la fuente energética principal de las células, especialmente las cerebrales, quienes tienen demandas energéticas elevadas y son incapaces de almacenar moléculas de alta energía, como glucógeno y lípidos (Schönfeld y Reiser, 2013; Vilchez y col., 2007).

La cadena de transporte de electrones se ubica en la membrana interna de la mitocondria y se conforma por cinco complejos proteicos: NADH deshidrogenasa (complejo I), succinato deshidrogenasa (complejo II), ubiquinol-citocromo-c reductasa (complejo III), citocromo oxidasa (complejo IV) y ATP sintasa (complejo V). Los complejos I y II extraen dos electrones a través de la oxidación de las coenzimas NADH (nicotinamida adenina dinucleótido) y FADH₂ (flavín adenín dinucleótido), respectivamente, para energizar la respiración celular. Los complejos I, III y IV emplean estos electrones para bombear protones hacia el espacio intermembranal y generar un gradiente electroquímico. Los complejos I y III bombean cuatro protones con la energía de dos electrones, mientras que el complejo IV bombea dos protones y transfiere los electrones al oxígeno, su aceptor final, mediante la síntesis de agua. Por último, el complejo V usa el gradiente electroquímico para la formación de ATP. (Mattson y col., 2008; Mazat y col., 2013).

En condiciones normales, 1-5 % del oxígeno de la respiración celular no se transforma en agua, sino que se convierte en especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés; Wei y col., 2001), por lo que se estima que gran parte de las ROS intracelulares son producidas por mitocondria. La producción de radicales de superóxido ocurre en dos puntos discretos de la cadena de transporte, en el complejo I y el complejo III (Finkel y Holbrook, 2000). Adicionalmente a sus actividades energéticas, la mitocondria desarrolla otras funciones homeostáticas celulares como amortiguar los niveles intracelulares de Ca²⁺, regular las vías de muerte celular y alojar numerosas vías biosintéticas (Eisner y col., 2018; Spinelli y Haigis, 2018).

La actividad mitocondrial puede ser regulada por diferentes factores, entre los que se encuentra el estrés, el cual causa alteraciones sistémicas a partir de los receptores de glucocorticoides (GR). Se ha mostrado que la exposición de neuronas a

glucocorticoides causa la translocación de los GRs a la membrana mitocondrial y que el ADN mitocondrial tiene secuencias parcialmente homólogas a elementos de respuesta a glucocorticoides (Kokkinopoulou y Moutsatsou, 2021; Sharma y col., 2021). Se ha reportado que los glucocorticoides tienen un efecto bifásico en la dinámica mitocondrial de las neuronas, de tal modo que, dosis bajas potencian diferentes aspectos de la función mitocondrial como la OXPHOS, el potencial de membrana y la capacidad de amortiguamiento de calcio. La dosis altas y crónicas, por otro lado, tienen efectos atenuantes sobre estos mismos elementos (Du y col., 2009; Katyare y col., 2003).

1.3.1. Mitocondria y plasticidad neuronal

La plasticidad neuronal refiere a la capacidad del cerebro de someterse a cambios fisiológicos en respuesta a un estímulo, lo cual es fundamental en el aprendizaje y la memoria. Este proceso conlleva el ajuste de intensidad, conectividad y estructura de redes cerebrales (Cheng y col., 2010). La intensidad sináptica puede incrementar (potenciación a largo plazo) o reducirse (depresión a largo plazo) dependiendo del contexto neuronal y el origen del estímulo (Oswald y col., 2018). Las sinapsis son los puntos de comunicación electroquímica entre neuronas, compuestas por una neurona presináptica y una postsináptica, separadas por un espacio extracelular. En una sinapsis química, la neurona presináptica libera vesículas acarreadoras de neurotransmisores al espacio extracelular en respuesta a un influjo de Ca^{2+} causado por un potencial de acción. Los neurotransmisores se unen a receptores en la neurona postsináptica, quienes inducen la generación de un nuevo potencial de acción que desencadena interacciones con otras neuronas (Di Maio, 2008). Mantener los gradientes electroquímicos, así como liberar y reciclar vesículas sinápticas son procesos energéticamente demandantes, que deben realizarse en regiones específicas del soma neural en intervalos de tiempo estrictos. Asimismo, la regulación en los niveles de Ca^{2+} es indispensable para la señalización (Devine y Kittler, 2018). La mitocondria es capaz de atender a estas demandas específicas de la sinapsis, gracias a sus funciones metabólicas.

Las mitocondrias neuronales forman una red dinámica y adaptable, con amplia variabilidad en tamaño y forma (Misgeld y Schwarz, 2017). Estudios de imágenes de células vivas *in vitro* e *in vivo* han mostrado que su configuración espacial varía continuamente (Sheng, 2017). Se piensa que su distribución es contextual y que se encuentra regulada por las demandas metabólicas de la neurona (Obashi y Okabe, 2013). Se ha mostrado que axones presinápticos presentan abundancia de mitocondrias (Hollenbeck y Saxton, 2005) y se ha propuesto que estas proveen el ATP necesario para el reciclaje de vesículas sinápticas (Harris y col., 2012). Particularmente, un modelo knock-out en *Drosophila* de Drp1, proteína clave en el reclutamiento mitocondrial, mostró que la falta de mitocondrias en la sinapsis resultaba en la decaída de la neurotransmisión durante estimulación elevada debido al déficit de movilización de vesículas de reserva derivado de restricción de ATP (Verstreken y col., 2005). La energía provista por las mitocondrias es indispensable para la remodelación de los circuitos neuronales mediante el establecimiento y eliminación de sinapsis. Estudios realizados en *Drosophila* mostraron que la presencia de mitocondrias en espinas dendríticas es esencial para su morfogénesis y el mantenimiento de sinapsis (Li y col., 2004). Por otro lado, en cultivos de hipocampo, se mostró que la activación local de la vía mitocondrial de apoptosis mediante caspasas participa en el podado de espinas postsinápticas (Ertürk y col., 2014).

La generación energética en mitocondria mediante OXPHOS conlleva la producción secundaria de ROS, la cual se ha asociado con peroxidación de la membrana lipídica, oxidación proteica y daño en ácidos nucleicos (Rogers, 2020), así como el desarrollo de neuropatías, por lo que las células cuentan con mecanismos para su neutralización (Angelova y Abramov, 2018). Sin embargo, se ha reconocido que las ROS participan en la regulación de vías de señalización importantes (Oswald y col., 2018). Mediante estudios sobre potenciación a largo plazo en rebanada de hipocampo se observó que la elevación de ROS facilita la potenciación, mientras que la adición de concentraciones altas de antioxidantes (Klann, 1998) y la desregulación de la producción de ROS la impide (Thiels y col., 2000), lo que sugiere que la

potenciación a largo plazo requiere de la presencia moderada de ROS. No se conocen todos los elementos que son afectados por la presencia de ROS, pero se ha reportado que modulan la expresión de los receptores de GABA, AMPA y NMDA (Accardi y col., 2014; Esteras y col., 2022).

Además de sus funciones energéticas, la mitocondria es un componente importante en el control de la señalización por Ca^{2+} . Durante periodos de excitación neuronal, la mitocondria amortigua la entrada de Ca^{2+} a la célula, primero, mediante el secuestro de iones calcio a su matriz y, después por su emisión controlada que mantiene la concentración citosólica constante (Walters y Usachev, 2023). Se ha mostrado experimentalmente que la regulación mitocondrial de Ca^{2+} modula la señalización sináptica, controlando la propagación inicial de vesículas y reduciendo la frecuencia de corrientes excitatorias postsinápticas espontáneas, así como la liberación asincrónica de neurotransmisores (David y Barrett, 2003; Kwon y col., 2016).

1.3.2. Actividad mitocondrial y memoria

Diferentes líneas de evidencia han expuesto la relación entre la actividad mitocondrial y la memoria. Un estudio genético en ratas desarrollados por Roubertoux y col. (2003) mostró que los polimorfismos SNP (Single Nucleotide Polymorphism) en genes mitocondriales codificantes de proteínas impactaban significativamente las habilidades cognitivas de los sujetos, particularmente en la velocidad de aprendizaje y la adquisición de las tareas de Krushinsky, laberinto radial y MWM. La comparación de material genético indicó que los puntos de divergencia se encontraban en regiones asociadas con los complejos I y IV mitocondrial, por lo que se propuso que las variaciones en desempeño se derivaban de cambios en la respiración celular.

En estudios en las etapas de formación de la memoria, se ha encontrado que las neuronas incrementan su demanda energética durante la consolidación y que la restricción de los sistemas de abastecimiento de ATP tiene efectos nocivos para la formación de la memoria, como se observó en la investigación en pollos realizada por Gibbs y Ng (1984), en donde la administración intracraneal de 2,4-dinitrofenol

(DNP), un desacoplador de la fosforilación oxidativa, durante el periodo de consolidación (5-25 min posteriores al aprendizaje) tuvo un efecto negativo en la retención de la tarea de evitación inhibitoria. El trabajo realizado por O'Dowd y col. (1994) reafirmó la importancia del abastecimiento energético en la consolidación cuando obtuvo resultados similares a Gibbs y Ng (1984), en el mismo modelo experimental, después de administrar fármacos que obstruían el ciclo de glicólisis. Por el contrario, investigaciones con azul de metileno, acelerador de la respiración celular mediante su interacción con el citocromo C, mostraron que su administración en dosis bajas inmediatamente después del entrenamiento facilitaba la adquisición de la tarea de tablero perforado (Callaway y col., 2004) y de reconocimiento de objeto (Riha y col., 2005). Interesantemente, la administración de dosis mayores de azul de metileno ha tenido efectos neuronales negativos, lo que se ha vinculado con el aumento en la producción de ROS mitocondriales (Rojas y col., 2012).

Amplia evidencia muestra el vínculo entre las maladaptaciones energéticas y el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, en donde se ha propuesto que la sobreproducción de ROS es uno de los factores contribuyentes a su aparición (Bhat y col., 2015). Se ha mostrado que la exposición prolongada a altas concentraciones de agentes inhibidores del complejo I (rotenona) y complejo II (ácido 3-nitropropiónico) generan sintomatologías análogas a enfermedades neurodegenerativas, Parkinson y Huntington, respectivamente, entre las que sobresale el impedimento cognitivo (Ibarra-Gutiérrez y col., 2023; Upadhyay y col., 2023). La administración de antioxidantes, como la melatonina, ha ayudado a conservar la memoria y a reducir el daño neural causado por la obstrucción de la OXPHOS (Mu y col., 2011).

Acorde con la información expuesta, se propuso que la inhibición mitocondrial en el estriado durante la consolidación de una tarea de procedimiento perjudicaría su retención. Para probar esta hipótesis, se entrenó grupos de ratas en la tarea del MWM con clave e inmediatamente después se administró localmente un inhibidor del complejo I mitocondrial (rotenona) o vehículo en el DS. Se evaluó la memoria 48

horas después. Adicionalmente, se indagó sobre la participación de la señalización por glucocorticoides en la actividad mitocondrial durante la consolidación mediante la administración secuencial de un inhibidor del GR (RU-486) y rotenona en sujetos entrenados en el MWM con clave. Paralelamente se estudió el efecto *ex vivo* de la exposición a rotenona sobre el potencial de membrana mitocondrial.

2. OBJETIVOS

2.1. General

Determinar el efecto de la inhibición mitocondrial del estriado dorsal durante la consolidación de una memoria de procedimiento

2.2. Específicos

- Evaluar el efecto de la inhibición del complejo I mitocondrial en el estriado dorsal sobre la consolidación de la tarea del laberinto acuático de Morris con clave
- Asociar los cambios en expresión de Arc en el estriado dorsal derivados de la inhibición del complejo I mitocondrial durante la consolidación
- Evaluar la acción conjunta de los receptores de glucocorticoides y la inhibición mitocondrial en la consolidación de la tarea del laberinto acuático de Morris con clave
- Analizar mediante fluorescencia los cambios en el potencial de membrana mitocondrial derivados de la exposición a un inhibidor del complejo I mitocondrial de rebanadas de estriado dorsal

3. METODOLOGÍA

Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo con los lineamientos del Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (013) y de la Universidad Autónoma de Querétaro (CBQ23/123) para el uso de animales experimentales, acordes con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (2001) y las normas estipuladas en la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council, 2011).

3.1. Materiales

3.1.1. Reactivos

3.1.1.1. Cirugía estereotáxica

- 1) Pentobarbital sódico (Aranda Laboratorios)
- 2) Atropina (Pisa)
- 3) Adrenalina (Pisa)
- 4) Xilocaína (Pisa)
- 5) Solución salina 0.9 % (Pisa)
- 6) Tintura de yodo (Jaloma)

3.1.1.2. Preparación de fármaco y administración

- 1) DMSO (Sigma-Aldrich)
- 2) PEG (Sigma-Aldrich)
- 3) Rotenona (Enzo Life Sciences, ALX-350-360)
- 4) Solución salina 0.9 % (Pisa)
- 5) RU-486 (Sigma-Aldrich, 84371-65-3)
- 6) Etanol absoluto (J.T. Baker)

3.1.1.3. Procesamiento de tejido

- 1) Isopentano (Sigma-Aldrich)
- 2) Etanol absoluto (J.T. Baker)

- 3) Etanol 96 % (Nieto Hermanos)
- 4) Acetato de violeta de cresilo (Sigma-Aldrich)
- 5) Permunt (Fisher Scientific)
- 6) Xileno (JT Baker)
- 7) Ácido acético glacial (Productos Químicos Monterrey)
- 8) Agua desionizada

3.1.1.4. Western blot

- 1) Buffer de lisis (Abcam #ab152163)
- 2) Reactivo de Bradford (Bio-Rad)
- 3) 2-Mercaptoetanol (Bio-Rad Laboratories)
- 4) Buffer Laemmli (Bio-Rad Laboratories)
- 5) Leche descremada (Bio-Rad Laboratories)
- 6) TBS (Tris-Buffer Salina; Bio-Rad Laboratories)
- 7) Agente quimioluminiscente (ECL, GE Healthcare)
- 8) Anticuerpo anti-Arc, conejo (Abcam, #ab183183)
- 9) Anticuerpo anti-GAPDH, conejo (Invitrogen, #MA5-31976)
- 10) Anticuerpo anti-conejo, cabra (Abcam, #ab6721)
- 11) TRIS-HCl (ThermoFisher)
- 12) Acrilamida (Bio-Rad Laboratories)
- 13) TEMED (Bio-Rad Laboratories)
- 14) SDS (Bio-Rad Laboratories)
- 15) Tetrametiletilendiamina (Bio-Rad Laboratories)
- 16) Persulfato de amonio (Sigma-Aldrich)
- 17) Solución reveladora (Carestream)
- 18) Solución fijadora (Carestream)

3.1.1.5. Análisis de actividad mitocondrial

- 1) Cloruro de sodio (Sigma-Aldrich)
- 2) Cloruro de potasio (Sigma-Aldrich)

- 3) Bicarbonato de sodio (Sigma-Aldrich)
- 4) Cloruro de calcio (Sigma-Aldrich)
- 5) Glucosa (Sigma-Aldrich)
- 6) Cloruro de magnesio (Sigma-Aldrich)
- 7) HEPES (Thermofisher)
- 8) Mitotracker Red CMXRos (Thermofisher, M7512)
- 9) Paraformaldehido (Sigma-Aldrich)
- 10) Sacarosa (Sigma-Aldrich)
- 11) Negro de Sudán (Sigma-Aldrich)
- 12) SYTOX Green (ThermoFisher, S7020)

3.2. Método

3.2.1. Sujetos

Se emplearon ratas Wistar macho (250-350 g al momento de cirugía) obtenidas del bioterio del Instituto de Neurobiología, de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los sujetos fueron albergados en cajas de alojamiento individual (45.5 cm x 25.1 cm x 19.5 cm) en el bioterio del laboratorio con condiciones controladas de temperatura (22 °C), humedad (60-70 %), un ciclo de 12 h de luz/oscuridad (07:00-19:00 h, luz) y acceso *ad libitum* a agua y alimento (dieta para roedores, LabDiet). Se cambió el agua de los bebederos una vez por semana. Las cajas de alojamiento se cambiaron los lunes y jueves. Las cajas de alojamiento fueron etiquetadas con el nombre del experimentador responsable, el número experimental correspondiente, la fecha y peso del animal al llegar al bioterio. Los animales fueron identificados con su número experimental escrito en su cola con marcador indeleble.

3.2.2. Manipulación

Los animales fueron manipulados durante dos días, en sesiones de 5 min, previo a la cirugía, con la finalidad de familiarizar a los animales con el experimentador. Antes del entrenamiento, las ratas recibieron tres sesiones de manipulación en días consecutivos, para asegurar el bienestar del animal y la limpieza de las cánulas.

3.2.3. Cirugía estereotáxica

Los sujetos fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/kg) e inmediatamente después recibieron una inyección intraperitoneal de atropina (0.4 mg/kg) para regular su respiración. Los sujetos anestesiados fueron montados en un aparato estereotáxico (Stoelting Co., IL) y se insertaron cánulas (11 mm, calibre 23) bilateralmente en el DS siguiendo las coordenadas indicadas por Paxinos y Watson (2007): anteroposterior (AP): + 0.4 mm de bregma, mediolateral (ML) \pm 3.2 mm y dorsoventral (DV): + 4.2 mm debajo de la superficie craneal. Se insertaron estiletes (11 mm de longitud) en cada cánula para conservarlas libres de obstrucciones. Los estiletes solo fueron retirados durante las sesiones de manipulación y la administración de sustancias. Las ratas tuvieron un periodo de recuperación de seis días antes de iniciar con los procedimientos conductuales.

3.2.4. Entrenamiento

Las ratas fueron entrenadas en la tarea del MWM con clave. El aparato se compuso por un tanque plástico de 1.54 m de diámetro y 0.60 m de altura. El tanque se llenó con agua (25 ± 2 °C) a una profundidad de 21 cm. Se introdujo una plataforma dentro del laberinto, sujeta a una clave, un cilindro de madera afranjado con cinta verde y blanca. Para evitar que los sujetos se auxiliaran de otros indicadores visuales, se rodeó al tanque con una cortina negra.

Durante el entrenamiento de la tarea los sujetos debieron aprender a escapar del laberinto a través de la localización de la plataforma. La sesión de entrenamiento consistió en 8 ensayos, donde se colocó a la rata en el agua mirando hacia la pared del tanque, en el cuadrante opuesto a la plataforma y a una distancia constante de ella. En cada ensayo, la plataforma fue cambiada de posición semialeatoriamente a uno de cuatro cuadrantes imaginarios. Cada ensayo duró un máximo de 60 s, con espacios de descanso de 30 s entre ellos. Una vez que la rata llegaba a la plataforma, se contaban 10 s antes de extraerla. Si la rata no lograba ubicar la plataforma en el

tiempo establecido, el experimentador la guiaba a ella y dejaba que transcurrieran los 10 s correspondientes. Mediante un software de detección, ANY-MAZE (ver 4.82, Stoelting Co.), se registró el tiempo de llegada a la plataforma (latencia de escape), la distancia recorrida y la velocidad de nado.

3.2.5. Prueba de retención

Transcurridas 48 h después de la sesión de entrenamiento, se efectuó una prueba de retención. Se realizaron 4 ensayos en condiciones idénticas al entrenamiento, donde se midieron los mismos parámetros. Únicamente los datos del primer ensayo fueron utilizados como referencia para la retención. Las mediciones subsecuentes se emplearon como indicador del nivel de retención de la tarea. Una menor latencia de escape se consideró como una mejor memoria de retención de la tarea.

3.2.6. Preparación de fármacos y administración

Para inhibir la actividad mitocondrial, se administró rotenona diluida en una solución 1:1:2.6 de dimetilsulfóxido (DMSO), polietilenglicol y solución salina (modificado de Mulcahy y col., 2011). La dosis fueron 0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (ROT 0.8 μg), 1.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (ROT 1.2 μg) y vehículo (ROT VEH).

La administración bilateral de la rotenona o vehículo en el DS se realizó inmediatamente después del entrenamiento. Se insertaron inyectores que sobresalían 1 mm de la punta de la cánula y se infundió un volumen de 0.5 μL por hemisferio a una velocidad de 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ mediante una bomba de microinfusión automatizada (WPI, modelo 220i). Los inyectores permanecieron colocados durante 60 s adicionales, antes de ser retirados para garantizar la infusión del fármaco.

Para estudiar la interacción del receptor de glucocorticoides y la rotenona, se preparó una solución de RU-486, de acuerdo con el protocolo de estudios previos (Medina y col., 2007; Sánchez-Resendis y col., 2012). Se preparó un stock disolviendo 5 mg de RU-486 en 3.33 ml de etanol absoluto. Esta preparación se aisló de la luz y se conservó a - 20 °C. A partir del stock se preparó una dilución de RU-486 a una

concentración de 10 ng/ μ L. Para el vehículo de RU-486, se realizó una dilución de solución salina y etanol al 2 %. Los tratamientos fueron RU-486 10 ng / μ L con rotenona 0.8 μ g/ μ L (RU 10 ng / ROT 0.8 μ g) y vehículo de RU-486 con rotenona 0.8 μ g/ μ L (RU VEH / ROT 0.8 μ g).

La administración bilateral de RU-486 o su vehículo y rotenona (0.8 μ g/ μ L) en el DS se realizó inmediatamente después del entrenamiento. Se infundió un volumen de 0.5 μ L de RU-486 (10 ng/ μ L) o vehículo a una velocidad de 0.5 μ L/min, por hemisferio, 5 min después se administró 0.5 μ L de rotenona (0.8 μ g/ μ L) bajo las mismas condiciones. Para ambos tratamientos, los inyectores permanecieron colocados durante 60 s adicionales antes de ser retirados, para garantizar la infusión del fármaco.

3.2.7. Procesamiento de tejido

Los sujetos fueron sacrificados por decapitación 1 h después de la prueba de retención. Los cerebros fueron extraídos y congelados por 1 min con isopentano (C_5H_{12}), mantenido a temperatura fría con hielo seco (CO_2), en un intervalo de 3-4 min después de la decapitación. Para confirmar la inserción correcta de las cánulas, se realizaron cortes coronales (50 μ m de grosor) de la región correspondiente al DS, los cuales fueron teñidos con la técnica de Nissl (Paul y col., 2008) y analizados bajo un microscopio de luz. Solo se consideraron los resultados de aquellas ratas que presentaron ambas cánulas en la posición correcta. Adicionalmente, se recolectó una muestra de tejido de DS de ambos hemisferios y se congeló para su análisis posterior por medio de western blot.

Para la prueba de actividad mitocondrial, se emplearon 4 animales que permanecieron en su caja de alojamiento hasta el momento del sacrificio. Inmediatamente después de la extracción del cerebro, se tomó una rebanada correspondiente al DS para su marcaje con fluoróforos para el análisis del potencial de membrana mitocondrial.

3.2.8. Preparación de gel de poliacrilamida

El gel de poliacrilamida al 10 % que se utilizó en la electroforesis se compone de dos elementos, el gel resolvidor y el gel concentrador. El gel resolvidor se preparó en la base del marco de electroforesis y se elaboró con 4.04 ml de H₂O, 2.5 ml de TRIS-HCl 1.5 M (pH 8.8), 3.3 ml de acrilamida (30 % acrilamida, 2.67 % N'-N'-Bismetilen-acrilamida) y 100 µL SDS 10 %. Se inició la polimerización con 5 µL de TEMED (tetrametiletilendiamina) y 50 µL de persulfato de amonio al 10 %. El gel se solidificó a los 15 min, aproximadamente. Sobre el gel resolvidor se agregaron las soluciones para preparar el gel concentrador: 3.05 ml de H₂O, 1.25 ml de TRIS-HCl 0.5 M (pH 6.8), 0.65 ml de acrilamida (30 % acrilamida, 2.67 % N'-N'-Bismetilen-acrilamida) y 50 µL SDS 10%. Se inició la polimerización con 5 µL de TEMED (tetrametiletilendiamina) y 25 µL de persulfato de amonio al 10 %. La polimerización tomó 15 min.

3.2.9. Western blot

Se seleccionaron aleatoriamente seis muestras de tejido de DS por grupo de tratamiento. Se agregaron 100 µL de buffer de lisis a cada muestra de tejido de DS y se le procesó mediante un homogeneizador. Las muestras fueron centrifugadas a 3500 rpm por 15 min, posteriormente, se recuperó el sobrenadante, se le colocó en un tubo limpio y se resuspendió en 50 µL de buffer de lisis al 10 %. Cada tubo fue mezclado por 60 s en un vórtex. Se calculó la concentración proteica total con el método de Bradford de los extractos (Bradford, 1976) y se determinó el volumen necesario en cada caso para la preparación de muestras de 10 µg de proteína. Para llevar a cabo la electroforesis, las muestras se prepararon mediante la mezcla de sobrenadante y buffer de carga (47.5 % buffer Laemmli, 5 % 2-mercaptoetanol) y se trataron a baño maría en ebullición por 5 min. Las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10 %, en donde se dejaron correr a 60 V por el gel concentrador y a 100 V en el gel resolvidor. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa a 20 V por 30 min en un sistema semisecco. Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5 % por 2 h.

El marcaje con anticuerpo primario de conejo se realizó incubando por una noche con anticuerpos anti-ARC (1:1500) y anti-GAPDH (1:2000). Se eliminó el excedente mediante lavados con Tris-buffered saline 1X (TBS1X, por sus siglas en inglés) y se le incubó con anticuerpo secundario cabra anti-conejo (1:3000). Finalmente, se agregó el agente quimioluminiscente (ECL) para el revelado.

Se utilizó el software Image Lab para el análisis de resultados mediante densitometría. Para la comparación de resultados, se establecieron unidades arbitrarias dividiendo la densidad óptica de la banda de Arc entre la densidad de banda de su control de carga (GAPDH). Asimismo, se normalizaron los valores de densitometría de los sujetos tratados con rotenona entre los del grupo vehículo.

3.2.10. Análisis de actividad mitocondrial

Inmediatamente después del sacrificio las rebanadas fueron equilibradas con solución RINGER (155 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 1.9 mM NaHCO₃, 2.4 mM CaCl₂, 10 mM glucosa, 2 mM MgCl₂, 5 mM HEPES) a temperatura ambiente por 30 min. En un cuarto oscuro, con oxigenación y temperatura (37 °C) constantes, se les incubó con 0.5 µM MitoTracker Red CMXRos por 1 h diluido en solución RINGER con rotenona (500 nM; Kimura y col., 2012), realizando el tratamiento con rotenona de manera contrabalaceada en uno de los hemisferios muestreados. Una vez marcado el tejido con los fluoróforos, se colocó en paraformaldehído al 4 % y se le dejó fijar por un día. Los cortes fueron subsecuentemente procesados en un tren de 10, 20 y 30 % sacarosa por 24 h en cada concentración y, posteriormente fueron crioseccionados (16 µm). Los tejidos fueron teñidos con Negro de Sudán (0.01 % en 70 % etanol) y contra teñidos con SYTOX Green (600 nM) para el marcaje nuclear. Los lavados se realizaron con TBS1X.

3.2.11. Microscopía confocal y análisis de imágenes

Se tomaron micrográficas del DS teñido con MitoTracker Red mediante un microscopio confocal LSM 780 (Carl Zeiss), con una magnificación de 40X y plano

focal único. Se realizaron tres cortes por hemisferio, se tomaron seis micrografías por hemisferio, generando un total de 12 micrografías por sujeto. La configuración de brillo y contraste, así como el análisis de la imagen se realizó mediante el software ImageJ. El método de cuantificación de células positivas consistió en un análisis semiautomático, donde la señal nuclear se utilizó como máscara de área (Miura y Sladoje, 2020; Paul-Gilloteaux y col., 2021) la cual fue agrandada para determinar el valor promedio de fluorescencia en cada célula. Una vez recopilada la información en una base de datos, se seleccionó una célula patrón como referencia de valor positivo, que se comparó con todas las imágenes. Aquellas células con lecturas superiores a la célula patrón fueron consideradas positivas. La célula patrón siempre fue tomada de imágenes del hemisferio control (sin tratamiento) para asegurar que se referenciaba el valor basal del marcaje.

3.2.12. Desecho de residuos peligrosos

La recolección y separación de los residuos biológico-infecciosos producidos como cadáveres, materiales de curación, materiales desechables, materiales absorbentes y objetos punzocortantes; se realizó de acuerdo con las condiciones estipuladas en la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 (2003). La disposición final de los residuos estuvo a cargo del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

3.2.13. Análisis estadístico

Para determinar la normalidad y homogeneidad de varianzas se realizó la prueba Shapiro-Wilks. Para el análisis conductual, se emplearon las latencias de escape del MWM y la velocidad de nado. Los datos de entrenamiento fueron valorados a través de un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, para comparar entre grupos. El desempeño durante la prueba de retención se analizó a través de un ANOVA de una vía. Cuando fue requerido, se aplicó una prueba *post hoc* de Tukey. La proporción de células positivas en el análisis de actividad mitocondrial se comparó con el hemisferio control mediante una prueba de t de Student no pareada. Los datos

obtenidos mediante western blot fueron sometidos a la prueba de t de una sola muestra. Los análisis estadísticos fueron realizados con el software Prism-GraphPad (ver 8.0.2, Dotmatics). Se consideró como significativo una $p < 0.05$ para todas las pruebas.

3.3. Diseño experimental

Para el estudio conductual del efecto del tratamiento de rotenona (ROT) sobre la consolidación, se formaron tres grupos independientes de ratas entrenadas de manera idéntica en la tarea del MWM en una sesión de 8 ensayos. Las variables dependientes que se evaluaron fueron latencia de escape (s) y velocidad de nado (cm/s). Cada sujeto recibió de manera semi aleatoria uno de los tratamientos (variable independiente) ROT VEH, ROT 0.8 μg o ROT 1.2 μg . La prueba se realizó en condiciones idénticas al entrenamiento en cuatro ensayos. Durante la prueba se evaluaron los mismos parámetros que en el entrenamiento. Se consideró una disminución de latencia de escape como una indicación de adquisición de la tarea. El diseño de grupos se resume en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Diseño de grupos conductuales experimento 1

Grupo	Tratamiento	n mínima
ROT VEH	Vehículo de rotenona	9
ROT 0.8 μg	Rotenona 0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	9
ROT 1.2 μg	Rotenona 1.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	9

Para el análisis de niveles de Arc mediante western blot se formaron aleatoriamente triadas que comprendían un sujeto con cada tratamiento: ROT VEH, ROT 0.8 μg y ROT 1.2 μg . La variable dependiente que se evaluó fue la densidad óptica de las bandas. La densidad óptica de Arc fue normalizada con su respectivo control de carga, GAPDH. El valor normalizado de los sujetos tratados con ROT fue normalizado con el VEH correspondiente a su triada. Los resultados se presentaron en veces de cambio de expresión de Arc contra GAPDH en relación con el VEH.

Para evaluar la interacción de la inhibición del complejo I mitocondrial con la señalización mediante glucocorticoides, se formaron dos grupos con base en el diseño del experimento conductual con rotenona. El entrenamiento fue idéntico. Se consideró el mismo tamaño de grupo y las variables dependientes. Cada sujeto recibió de manera semi aleatoria uno de los tratamientos RU 10 ng + ROT 0.8 µg o RU VEH + ROT 0.8 µg. Se realizó una prueba de cuatro ensayos. Durante la prueba se evaluaron los mismos parámetros. La disminución de la latencia de escape fue indicador de la retención de la tarea. El diseño de grupos se resume en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Diseño de grupos conductuales experimento 2

Grupo	Tratamiento	n mínima
RU VEH / ROT 0.8 µg	Vehículo de RU-486 y Rotenona 0.8 µg/µL	9
RU 10 ng / ROT 0.8 µg	RU-486 10 ng/ µL y Rotenona 0.8 µg/µL	9

Para el análisis de actividad mitocondrial se trató de forma contrabalanceada un hemisferio de cada sujeto con rotenona 500 nM en buffer mientras que el otro se mantuvo en buffer sin tratamiento. La variable dependiente evaluada fue la fluorescencia por célula. La célula positiva basal fue seleccionada arbitrariamente de un hemisferio sin tratamiento y se empleó para clasificar todas las células de los sujetos como positiva o negativa. Los resultados se presentaron como porcentaje de células positivas en ambos grupos.

4. RESULTADOS

4.1. Análisis histológico

Se analizaron los cerebros de las ratas sometidas a pruebas conductuales y solo los sujetos con cánulas localizadas en el DS (Paxinos y Watson, 2007) fueron usados para el análisis estadístico y la interpretación de resultados. La Figura 2 es un esquema representativo de la distribución de las puntas de los inyectores en los cerebros de los sujetos (N = 55). Se excluyeron ocho sujetos que presentaron inserciones de los inyectores fuera del DS y siete que, de acuerdo con las observaciones del experimentador, recibieron infusiones incompletas del tratamiento.

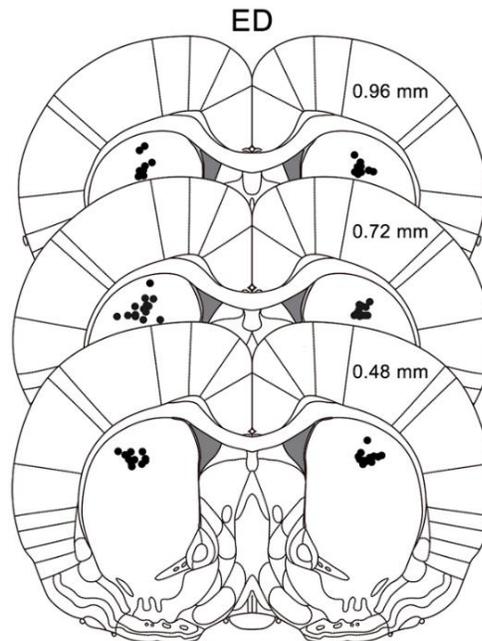


Figura 2. Diagrama de posicionamiento de puntas de microinyector. Coordenadas en milímetros desde bregma. Diagramas recuperados de Paxinos y Watson (2007).
n = 55.

4.2. Efecto de la inhibición de la actividad mitocondrial del estriado dorsal durante la consolidación

A fin de conocer la participación de la mitocondria del DS durante la consolidación de una memoria de procedimiento, se inhibió la transferencia de electrones del complejo I mitocondrial mediante rotenona. Se entrenó a ratas en la tarea del MWM con clave

e inmediatamente después se les administró rotenona (0.8 o 1.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) o vehículo. Se compararon las latencias de escape de los grupos a lo largo del entrenamiento (Figura 3A) mediante un ANOVA de dos vías. Se determinó que el factor ensayo influyó en el desempeño de los sujetos ($F(7, 248) = 23.44, p < 0.001$) y se comprobó la adquisición de la tarea a través de una comparación *post hoc* que indicó que la latencia de escape del primer ensayo era diferente a la del último en todos los grupos ($p < 0.001$, en todas las comparaciones). Por otro lado, el análisis del factor tratamiento, mostró que este no influyó en el desempeño de los sujetos ($F(2, 248) = 2.42, p = 0.09$), es decir, los grupos adquirieron la tarea de forma comparable. Finalmente, no se observó diferencia significativa en la interacción de los factores ($F(14, 248) = 0.68, p = 0.79$).

La latencia de escape podría variar en función de la velocidad de nado, además de la adquisición de la tarea (Figura 3B). Para controlar esta posibilidad, se realizó un ANOVA de dos vías a la velocidad de nado. Se encontró que ni el tratamiento, ni el ensayo eran fuentes significativas de variación ($F(2, 248) = 2.98, p = 0.05$ y $F(7, 248) = 0.83, p = 0.57$, respectivamente). No se encontró diferencia significativa en la interacción ($F(14, 248) = 0.68, p = 0.79$).

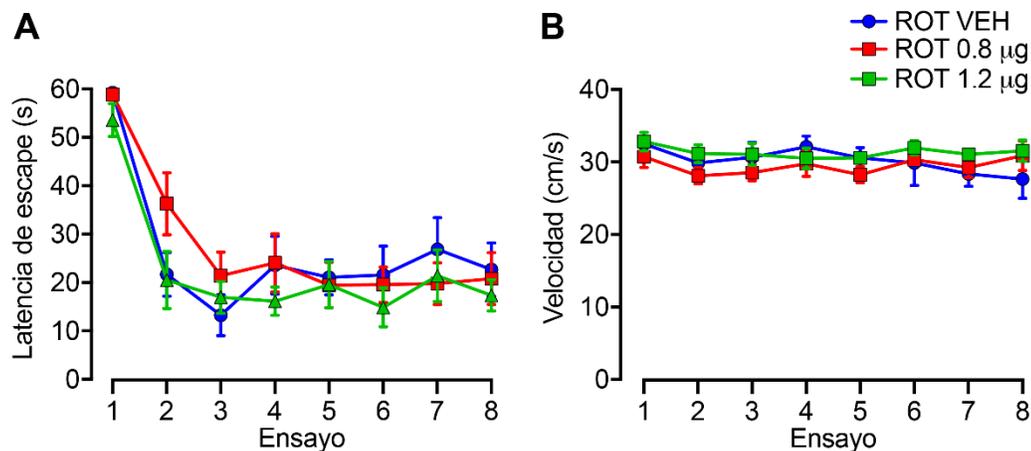


Figura 3. Entrenamiento experimento 1. A: Latencia de escape de los grupos experimentales. Existe diferencia significativa entre el primer y último ensayo en todos los grupos ($p < 0.001$). B: Velocidad de nado. No se reportó diferencia significativa entre grupos o ensayos ($p > 0.05$, en ambos casos). Para todos los grupos se graficó la media \pm EE de cada ensayo. $n = 11-12$

En la prueba de retención se compararon las latencias de escape (Figura 4) mediante un ANOVA de una vía, el cual mostró que el tratamiento tuvo un efecto sobre el desempeño de los sujetos ($F(2, 31) = 4.24, p = 0.02$). El análisis *post hoc* mostró que los grupos ROT 0.8 μg y ROT 1.2 μg presentaron latencias de escape significativamente más bajas en comparación al grupo VEH ($p = 0.04$ y 0.04 , respectivamente), lo cual indica una mejor retención. El mismo análisis no encontró diferencia significativa entre ambas dosis de rotenona ($p = 0.94$), lo que sugiere que su efecto sobre la consolidación no es dosis-dependiente dentro del rango presentado.

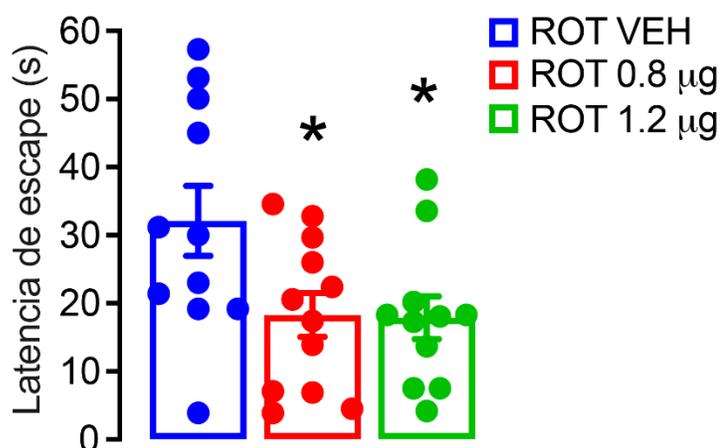


Figura 4. Prueba de retención 48 h después experimento 1. Los grupos ROT 0.8 μg y ROT 1.2 μg tuvieron una latencia de escape significativamente menor a VEH ($p = 0.043$ y 0.041 , respectivamente). Para todos los grupos se graficó la media \pm EE. Los círculos representan valores individuales. *: $p < 0.05$ con respecto a ROT VEH. $n = 11-12$

El día de la prueba, se realizaron cuatro ensayos (Figura 5A) para corroborar la consistencia en el desempeño de los sujetos. Un ANOVA de dos vías encontró que tanto el tratamiento, como el ensayo no eran fuentes significativas de variación ($F(2, 124) = 0.32, p = 0.32$ y $F(3, 124) = 0.52, p = 0.52$, respectivamente), pero se reportó una interacción significativa entre factores ($F(6, 124) = 3.11, p = 0.01$). El análisis *post hoc* indicó que el grupo VEH tuvo una diferencia significativa entre su primera y cuarta latencia ($p = 0.004$). Los grupos ROT 0.8 μg y 1.2 μg no presentaron diferencias significativas entre los ensayos del día de prueba ($p > 0.05$ en todos los

casos). Estos resultados sugieren que los grupos con tratamiento ROT alcanzaron su máximo desempeño durante la sesión de entrenamiento, mientras que el grupo VEH continuó adquiriendo la tarea durante la prueba.

El ANOVA de dos vías aplicado a la velocidad de nado durante la prueba (Figura 5B) no reportó efecto del tratamiento, ni del ensayo ($F(2, 124) = 0.10, p = 0.90$ y $F(3, 124) = 0.37, p = 0.77$, respectivamente), tampoco se encontró interacción entre factores ($F(6, 124) = 0.45, p = 0.84$) por lo que la diferencia en el desempeño es debido a la adquisición de la tarea.

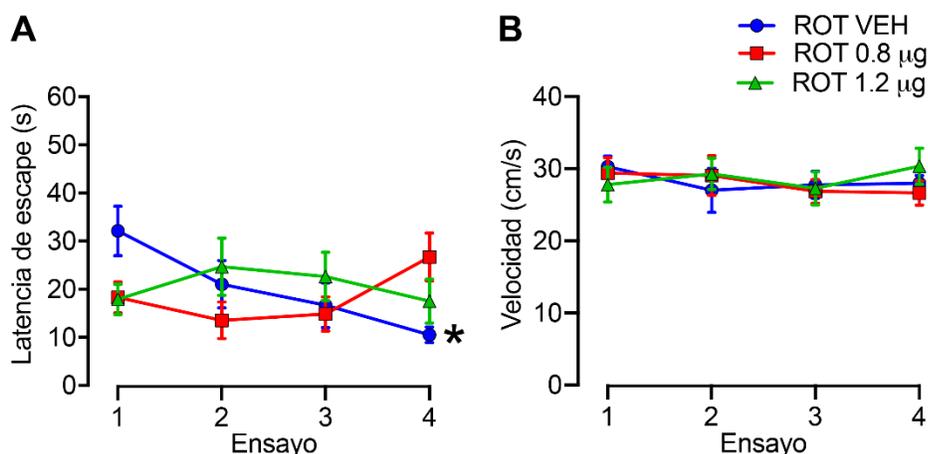


Figura 5. Ensayos 1-4 de retención experimento 1. A: El grupo VEH mejoró significativamente su desempeño del primer al cuarto ensayo de la prueba ($p = 0.004$), ambos grupos ROT se mantuvieron constantes ($p > 0.05$). B: La velocidad de nado no varió significativamente entre ensayos, ni grupos (0.774 y 0.902, respectivamente). Para todos los grupos se graficó la media \pm EE de cada ensayo. *: $p < 0.05$ contra el ensayo 1 del grupo VEH. $n = 11-12$

4.3. Presencia de Arc en el estriado dorsal durante la prueba de retención

Para evaluar el efecto de la administración de rotenona en la actividad neuronal, se examinaron los niveles proteicos totales de Arc en el DS de los sujetos entrenados en el MWM con clave a través de la técnica de western blot en condiciones desnaturizantes. El análisis mediante la prueba de t de Student de una sola muestra de los resultados normalizados de densitometría (Figura 6) mostró que la expresión de Arc en el grupo ROT 0.8 µg no era significativamente diferente a un valor teórico

de 100 % ($t(5) = 0.26, p = 0.80$), igualmente ROT 1.2 μg no fue diferente de la media ($t(4) = 0.74, p = 0.50$). Estos resultados sugieren que los tratamientos con rotenona dentro del rango empleado no influyeron de forma significativa en los niveles proteicos de Arc en el estriado durante la evocación.

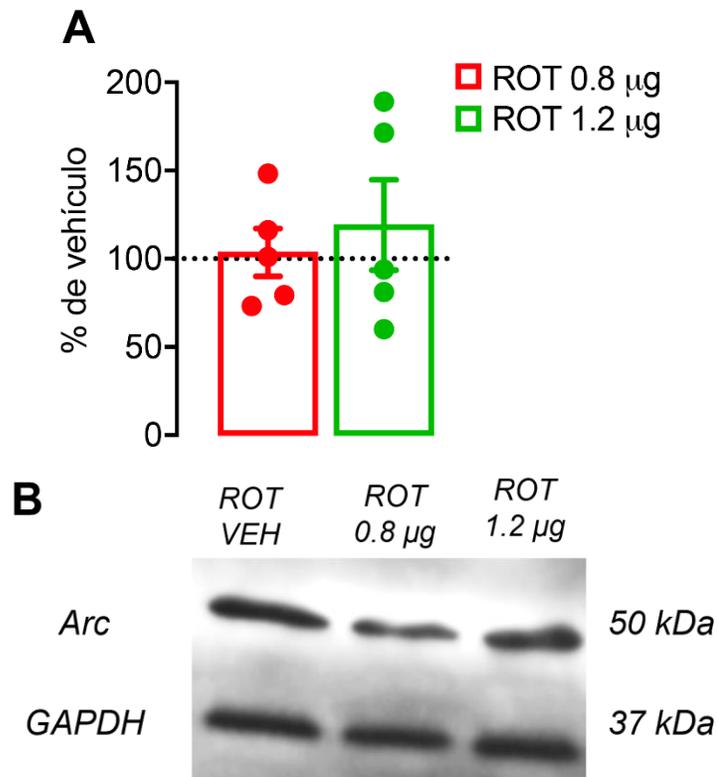


Figura 6. Densitometría de Arc en estriado. Los animales fueron sacrificados 1 h después de la prueba. A: Niveles de Arc total normalizados a GAPDH. B: Blots representativos. DO: Densidad Óptica. Para todos los grupos se graficó la media \pm EE. $n = 5$

4.4. Análisis de la acción conjunta de la actividad mitocondrial y los receptores de glucocorticoides

Para evaluar una posible interacción entre la señalización mediante glucocorticoides y la inhibición del complejo I en la consolidación de la memoria, se administró conjuntamente un inhibidor de receptores de glucocorticoides (mifepristona, RU-486) inmediatamente después del entrenamiento de la tarea del MWM con clave y 5 min después rotenona (0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). El ANOVA de dos vías de las latencias de escape de los sujetos durante el entrenamiento (Figura 7A) mostró diferencias significativas en

el factor ensayo ($F(7, 128) = 11.10, p < 0.001$), mientras que en el tratamiento no ($F(1, 128) = 2.56, p = 0.11$). No se reportó interacción entre los factores ($F(7, 128) = 1.05, p = 0.40$). Se comprobó la adquisición de la tarea mediante una comparación *post hoc* de Tukey, en la que se reportó que la latencia de escape del primer ensayo era significativamente diferente a la del octavo ensayo ($p < 0.001$, en ambas comparaciones).

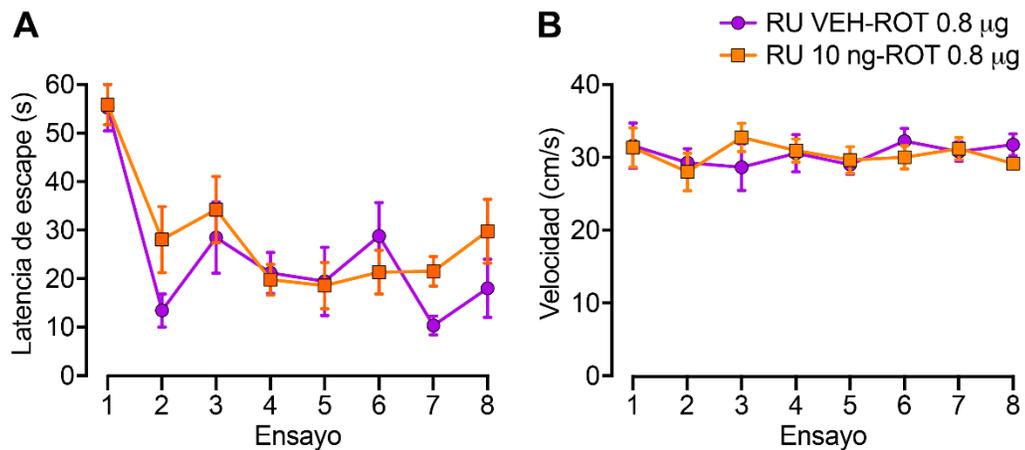


Figura 7. Entrenamiento experimento 2. A: Latencia de escape promedio de grupos experimentales. Existe diferencia significativa entre el primer y último ensayo en todos los grupos ($p < 0.001$). B: Velocidad de nado promedio. No hay diferencia significativa entre grupos o ensayos ($p > 0.05$, en ambos casos). Para todos los grupos se graficó la media \pm EE de cada ensayo. $n = 9$

El ANOVA de dos vías de las velocidades de nado (Figura 7B) mostró que tanto el tratamiento como el ensayo no fueron distintos durante el entrenamiento ($F(1, 128) = 0.01, p = 0.92$ y $F(7, 128) = 0.44, p = 0.88$, respectivamente) y que no existía interacción entre los factores ($F(7, 128) = 0.52, p = 0.82$). Esto indica que la variación en la latencia se debe a la adquisición de la tarea y no a la velocidad de desplazamiento de los sujetos.

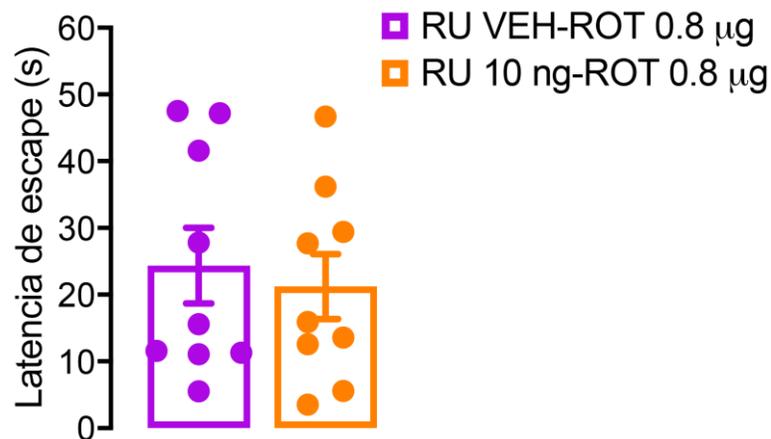


Figura 8. Prueba de retención de experimento 2. No se reportó una diferencia significativa en la latencia de escape entre los grupos ($p = 0.682$). Para todos los grupos se graficó la media \pm EE. Los círculos representan valores individuales. $n = 9$

Las latencias de retención (Figura 8) fueron comparadas mediante una prueba de t de Student no pareada. Se determinó que los grupos no eran significativamente diferentes entre sí, ($t(16) = 0.17$, $p = 0.68$), lo que sugiere que el efecto facilitador durante la consolidación del tratamiento con rotenona en el DS no se encuentra mediado por los receptores de glucocorticoides.

El ANOVA de dos vías de los 4 ensayos del día de la prueba (Figura 9A), mostró que no hubo diferencias significativas en los factores ensayo y tratamiento ($F(3, 64) = 0.92$, $p = 0.43$ y $F(1, 64) = 0.79$, $p = 0.38$, respectivamente) y que no existió interacción entre estos ($F(3, 64) = 0.59$, $p = 0.63$). La estabilización de la latencia de escape de los grupos sugiere que ambos alcanzaron su máximo desempeño en la tarea. Un ANOVA de dos vías de la velocidad de nado de estas pruebas (Figura 9B), tampoco mostró diferencias significativas en el factor ensayo o tratamiento ($F(3, 64) = 1.12$, $p = 0.35$ y $F(1, 64) = 2.20$, $p = 0.14$, respectivamente) así como en la interacción ($F(3, 64) = 0.65$, $p = 0.59$), por lo que se puede afirmar que el desempeño similar de los grupos es debido a que adquirieron la tarea en grado comparable y no por variaciones en sus habilidades motoras.

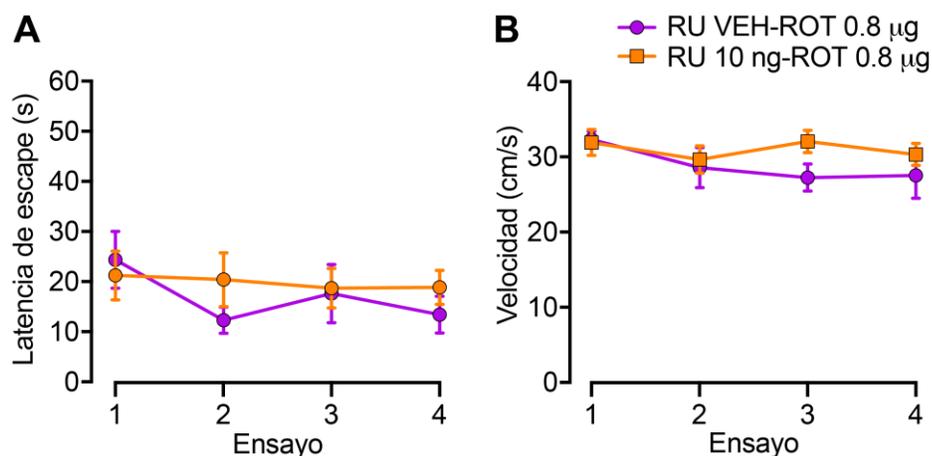


Figura 9. Ensayos 1-4 de retención experimento 2. A: No se reportó diferencia significativa en la latencia de escape en función del ensayo o el grupo ($p = 0.434$ y 0.377 , respectivamente). B: La velocidad de nado no varió significativamente entre ensayos, ni grupos (0.774 y 0.902 , respectivamente). Para todos los grupos se graficó la media \pm EE de cada ensayo. $n = 9$

4.5. Análisis del potencial de membrana mitocondrial en presencia de rotenona

Para corroborar el efecto de la rotenona sobre el complejo I mitocondrial en el DS, se analizó el potencial de membrana *ex vivo*, mediante la incubación simultánea de muestras de tejido con rotenona (500 nM) y MitoTracker Red. Las micrografías obtenidas (Figura 10B, C) fueron analizadas por medio del software ImageJ.

El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) fue valorado a través de la determinación de la proporción de células positivas MitoTracker Red/total de número de células en el DS (Figura 10 A), realizando las comparaciones estadísticas respecto al grupo intacto. El grupo tratado ROT (500 nM) disminuyó la cantidad de células positivas totales de forma significativa respecto al grupo intacto ($t(5) = 2.30$, $p = 0.03$). Esto sugiere que el inhibidor del complejo I mitocondrial disminuyó significativamente el $\Delta\Psi_m$, en células de DS de ratas intactas.

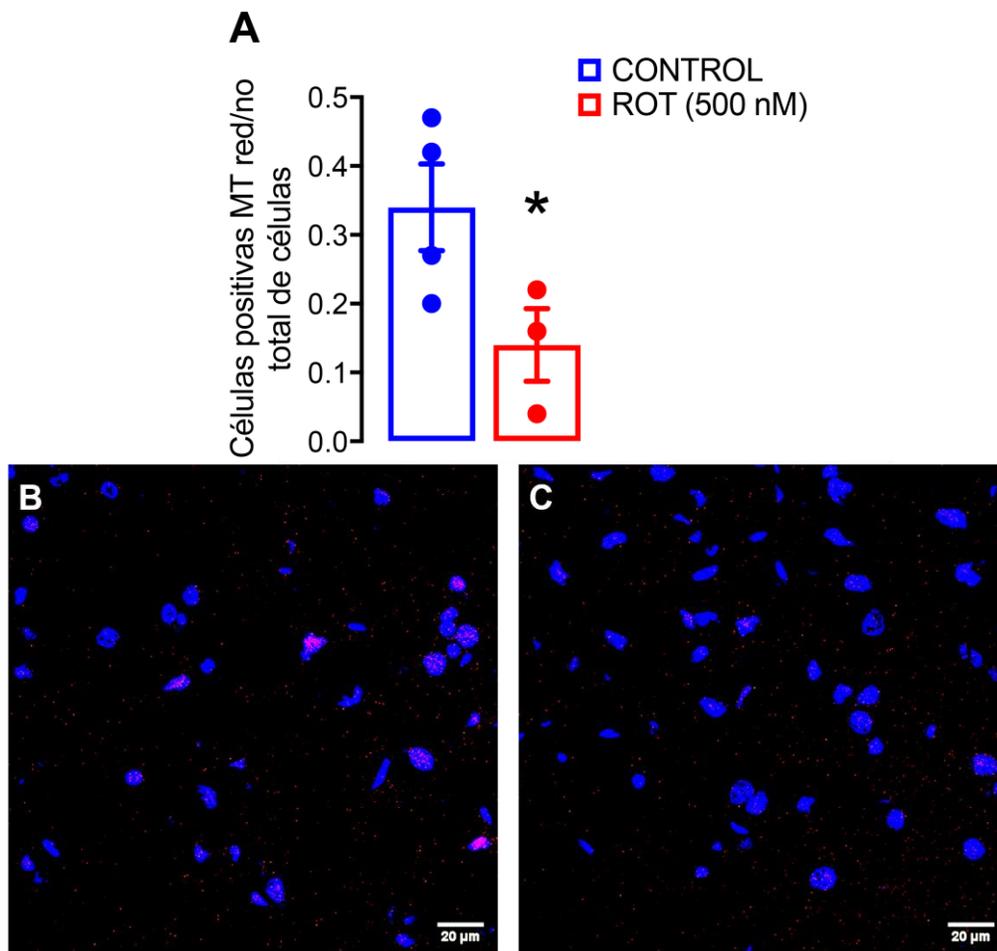


Figura 10. Análisis de actividad mitocondrial en el DS. A: La proporción de células positivas de ROT (500 nM) disminuyó significativamente respecto al grupo intacto ($p = 0.035$). B-C: Micrografías representativas de cortes coronales de DS en ratas, intacto (B) y tratado con 500 nM rotenona (C) con MitoTracker Red. Rojo: Mito Tracker red, Azul: SYTOX green. Se graficó media \pm EE. Los círculos representan valores individuales. *: $p < 0.05$ con respecto al intacto. $n = 3-4$

5. DISCUSIÓN

Los hallazgos presentados en este trabajo de investigación indican que el bloqueo parcial de la respiración celular, a través de la administración intracerebral de rotenona en el DS, facilitó la consolidación de una tarea de procedimiento (Figura 4). Estos resultados son contrarios a los planteados en la hipótesis del proyecto y a lo reportado en investigaciones similares, en donde se encontró que la obstrucción del metabolismo energético cerebral tiene efectos nocivos para la consolidación del aprendizaje (Gibbs y Ng, 1984; O'Dowd y col., 1994), pero es importante remarcar que estos experimentos intervinieron la energización celular en puntos metabólicos distintos. O'Dowd y col. (1994) trabajaron en un paso previo a la fosforilación oxidativa, obstruyendo la glicólisis, mientras que el equipo de Gibbs y Ng (1984) deterioró el gradiente electroquímico mitocondrial a través del secuestro de protones del espacio intermembranal. Es posible que el sitio particular de acción de la rotenona, el complejo I mitocondrial, sea la razón por la que se encontró el efecto facilitador de la memoria.

El complejo I mitocondrial cumple dos funciones en la OXPHOS: extrae electrones oxidando a la coenzima NADH y usa esta energía para el bombeo de protones al espacio intermembranal para la formación de un gradiente electroquímico (Mattson y col., 2008). La obstrucción del complejo I causa una disminución en la capacidad celular de síntesis de ATP, como pudo observarse en el análisis de actividad mitocondrial (Figura 10A), en donde la administración de rotenona en el estriado causó un decremento significativo en el potencial de membrana de las muestras. Sin embargo, esta obstrucción no implica el desacoplamiento total de la respiración celular, ya que la mitocondria cuenta con sitios alternos para la extracción de electrones (complejo II) y para el bombeo de protones (complejos III y IV; Zhao y col., 2019), por lo que queda la posibilidad de que las células empleen mecanismos compensatorios en sitios metabólicos previos o posteriores al complejo I.

Un estudio en cultivos de astrocitos reportó que la administración de rotenona incrementó tres veces su tasa glicolítica (Bittner y col., 2010), lo que sugiere que las

células responden al decremento en su eficiencia energética a través del aumento de su metabolización de glucosa. El malfuncionamiento congénito del complejo I está vinculado con neuropatías como el síndrome de Leigh (Smeitink y col., 2004) y su mutación espontánea se ha asociado con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (Bhat y col., 2015), sin embargo, en ambos casos, la sintomatología patológica se manifiesta después de un periodo prolongado de ineficiencia del complejo. Los sujetos en este trabajo solamente presentaron una inhibición temporal del complejo I, en dosis que no han reportado daños neuronales severos, ni disminución en habilidades motoras (Mulcahy y col., 2011), por lo que cabe la posibilidad de que los resultados conductuales de facilitación durante la consolidación deriven de un metabolismo temporalmente acelerado a razón de la exposición a rotenona.

El efecto facilitador del tratamiento con rotenona, probablemente se relaciona con las dosis bajas que se administraron (0.8 y 1.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), ya que se han reportado efectos nocivos a la viabilidad celular después de la administración intracerebral de concentraciones mayores de rotenona ($>3.6 \mu\text{g}/\mu\text{L}$; Mulcahy y col., 2011). Se ha identificado que este fármaco induce la expresión de citocinas proinflamatorias en tejido cerebral (Sharma y col., 2018), disminuye la estabilidad de microtúbulos en hipocampo (Bisbal y col., 2018), inhibe la autofagia (Jang y col., 2016) e incrementa la producción de ROS (Radad y col., 2006). Es probable que, si la dosis administrada incrementara o se volviera crónica, el beneficio sobre la consolidación desaparecería, o incluso, se revertiría, como se observa en protocolos de modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson, en donde la administración regular de rotenona genera deficiencias cognitivas (Innos y Hickey, 2021), sin embargo, es necesario explorar esta posibilidad experimentalmente.

El bloqueo del complejo I mitocondrial causaría, teóricamente, la acumulación de NADH, lo cual se ha observado en humanos. En estudios sobre pacientes con deficiencias en la respiración celular, se reportó que el 80 % de los sujetos con mutaciones en el complejo I presentaba un incremento significativo en la proporción

de lactato/piruvato, indicativo de un aumento en la proporción NADH/NAD⁺ (Munnich y col., 1996). Se ha observado experimentalmente que la administración directa de NADH en neuronas estimula la expresión de IEGs, como c-Fos y Arc, así como la fosforilación de Erk 1/2, lo que correlaciona a esta coenzima con la plasticidad neuronal (Liu y col., 2021; Yang y col., 2014). La facilitación en la consolidación que se observa en los grupos tratados con rotenona podría ser resultado de la estimulación de la plasticidad neuronal derivada de la acumulación temporal de NADH. Los estudios de western blot, realizados en este trabajo (Figura 6), no mostraron diferencias significativas en la expresión de Arc durante el periodo de prueba, lo que indica que no hay un incremento en la actividad neuronal durante la evocación causado por el tratamiento con rotenona, no obstante, se mantiene la posibilidad de que evaluaciones inmediatamente posteriores a la inyección intracerebral de rotenona muestren incrementos en Arc en los grupos tratados con rotenona, similares a los reportados en la literatura (Guzowski y col., 2000; Ploski y col., 2008).

La tarea del MWM se realiza en un contexto aversivo, lo cual induce la liberación de glucocorticoides, hormonas ampliamente relacionadas con la modulación del proceso de memoria de información con componentes emocionales (Choi y col., 2018; Roozendaal, 2000). Se ha reportado que los glucocorticoides, corticosterona en roedores, llevan a cabo sus efectos sobre la memoria principalmente a través del GR y se ha mostrado experimentalmente que la administración de antagonistas al GR, como RU-486, bloquea su efecto de facilitación o deterioro sobre la memoria (Roozendaal, 2002). Puntualmente, se ha reportado que la administración de RU-486 en DS después del entrenamiento bloquea el efecto facilitador de la consolidación de la corticosterona (Fuentes-Ibañez y col., 2021; Sánchez-Resendis y col., 2012). Al mismo tiempo, se ha reportado que los glucocorticoides inducen la translocación de GRs hacia mitocondrias cerebrales (Kokkinopoulou y Moutsatsou, 2021) y que la exposición momentánea a concentraciones bajas y altas de glucocorticoides tiene efectos positivos en la función mitocondrial de células corticales, particularmente en la OXPHOS y el amortiguamiento de los niveles de Ca²⁺ (Du y

col., 2009). Por estos motivos, se determinó prudente explorar una posible interacción entre los glucocorticoides y la inhibición del complejo I mitocondrial en la consolidación de la memoria.

No se observaron diferencias significativas en el desempeño de los grupos durante la prueba (Figura 8), lo que indica que el bloqueo de los GRs no inhibe el efecto facilitador de la rotenona. Este resultado puede explicarse desde diferentes perspectivas, por un lado, la acción de los glucocorticoides sobre la actividad mitocondrial durante la consolidación puede ocurrir independientemente de sus receptores. Estudios en neuronas hipotalámicas mostraron que la corticosterona disminuye la producción de ATP de forma independiente del receptor de glucocorticoides y que es atribuible a la inhibición directa del complejo I mitocondrial (Fujita y col., 2009). Por otro lado, un estudio en corteza prefrontal y cerebelo de fetos bovinos mostró que la administración de cortisol incrementaba la OXPHOS dependiente del complejo II, sin efectos significativos en el complejo I mitocondrial (Davies y col., 2022), lo que sugiere que la mayor interacción entre la señalización mediante glucocorticoides y el suministro energético mitocondrial es a través del complejo II. Finalmente, estudios en hipocampo, mostraron que la exposición aguda a estrés causó una disminución significativa en los niveles de expresión de genes de los complejos de la cadena de transporte de electrones, particularmente los del complejo I mitocondrial (ND-1, ND-3 y ND-6; Hunter y col., 2016), por lo que es posible que la acción del GR sea análoga a la de la rotenona y por eso no se observa un cambio en la conducta al inhibir su acción.

Los resultados conductuales muestran que los grupos adquirieron la tarea de manera comparable antes del tratamiento (Figura 3A, 7A). Estudios previos muestran que el MWM recluta al DS (Akirav y col., 2004; Baldi y col., 2003; Morris, 1984) y que el estriado es una estructura clave para las memorias de procedimiento por lo que los hallazgos obtenidos muestran una modulación sobre la memoria de procedimiento. Por otro lado, ya que la administración de los fármacos se realizó después del entrenamiento, durante la consolidación de la memoria, se pueden descartar efectos

inespecíficos de los tratamientos sobre motivación o la motricidad. Al analizar estadísticamente la velocidad de nado (Figura 3B y 7B), no se encontraron diferencias significativas entre grupos, concordando con los resultados obtenidos por Mulcahy y col. (2011) en un rango de dosis similar.

El volumen de fármaco administrado en este experimento fue efectivo para provocar facilitación en el desempeño. Antecedentes de estudios farmacológicos en el DS han utilizado esta medida (Goodman y Packard, 2014; Lozano y col., 2013; Siller-Pérez y col., 2017), sin embargo, una cantidad mayor ha sido probada en otros estudios (Medina y col., 2007; Quirarte y col., 2009). Esto podría iniciar una nueva indagación, estudiar el efecto del incremento del volumen de administración. De igual manera, debido a que el DS se divide en dos regiones y su funcionalidad es heterogénea (Goodman y Packard, 2018), la inhibición del complejo I mitocondrial podría ser dirigida a una región específica del estriado, el estriado dorsolateral, la cual se encuentra estrechamente relacionada a la memoria de procedimiento (Yin y Knowtton, 2004; Yin y col., 2009). Otros resultados también podrían surgir al realizar la inyección en un intervalo de tiempo diferente.

La medición de IEGs como Arc ha sido útil para evaluar actividad neuronal relacionada a plasticidad derivada de procesos mnemónicos (Daberkow y col., 2007; Gardner y col., 2016). Su expresión es importante en diferentes etapas de formación de la memoria principalmente durante la consolidación (Plath y col., 2006) pero también en la evocación (Nakayama y col., 2015; Ramírez-Amaya y col., 2005). Debido a que durante la evocación ocurre la reactivación de los conjuntos neuronales implicados en la consolidación (Frankland y col., 2019), el análisis de expresión de Arc después de la evocación se consideró como referencia de los posibles cambios plásticos ocurridos durante la consolidación.

No se encontraron diferencias significativas al analizar la expresión de Arc durante la evocación (Figura 6A), sin embargo, esta temporalidad experimental permitió maximizar los recursos provistos. La comprensión de la actividad neuronal inducida por el comportamiento también podría ser estudiada durante el proceso de

consolidación, ya que se conoce la relevancia de Arc en esta etapa (Epstein y Finkbeiner, 2018), mientras que, a nivel genético, se podría explorar el efecto de la rotenona sobre la expresión de otros IEGs como c-Fos o EGR-1 (Minatohara y col., 2016). En el aspecto técnico, la elaboración de western blot permitió un análisis semicuantitativo de la proteína situada en el DS, sin embargo, el uso de otras técnicas, como inmunohistoquímica, permitiría observar la proteína sobre el tejido diferenciando la expresión en las subregiones del DS, particularmente en el estriado dorsolateral.

Finalmente, estos hallazgos sugieren que la inhibición transitoria del complejo I mitocondrial facilita el proceso de consolidación de la memoria, particularmente del tipo de procedimiento. La relación de la mitocondria con la memoria es un tema poco explorado y el presente trabajo aporta evidencia de la complejidad de esta relación. El conocimiento profundo de esta relación podría contribuir en el entendimiento de la patogénesis de las enfermedades de Parkinson y Huntington, quienes presentan deficiencias mitocondriales en etapas tempranas. Este estudio podría ampliarse a través del uso de fármacos alternativos con mayor especificidad a las neuronas o con mecanismo distinto de obstrucción de la OXPHOS.

6. CONCLUSIONES

- 1) La inhibición del complejo I mitocondrial en el estriado dorsal por rotenona facilitó la consolidación de la tarea del laberinto acuático de Morris con clave.
- 2) La administración intracerebral de rotenona no alteró los niveles proteicos de Arc en el estriado dorsal durante la evocación de la tarea del laberinto acuático de Morris con clave.
- 3) La facilitación de la consolidación de la tarea del laberinto acuático de Morris con clave por rotenona no parece estar mediada por el receptor de glucocorticoides del estriado dorsal.

7. BIBLIOGRAFÍA

Accardi, M. V., Daniels, B. A., Brown, P. M., Fritschy, J. M., Tyagarajan, S. K. y Bowie, D. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species regulate the strength of inhibitory GABA-mediated synaptic transmission. *Nature Communications*, 5, 3168. <http://doi.org/10.1038/ncomms4168>.

Akirav, I., Kozenicky, M., Tal, D., Sandi, C., Venero, C. y Richter-Levin, G. (2004). A facilitative role for corticosterone in the acquisition of a spatial task under moderate stress. *Learning & Memory*, 11(2), 188–195. <https://doi.org/10.1101/lm.61704>.

Alberini, C. M. (2005). Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends in Neurosciences*, 28(1), 51-56. <http://doi.org/10.1016/j.tins.2004.11.001>.

Alberini, C. M., Milekic, M. H. y Tronel, S. (2006). Mechanisms of memory stabilization and de-stabilization. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(9), 999-1008. <http://doi.org/10.1007/s00018-006-6025-7>.

Albouy, G., King, B. R., Maquet, P. y Doyon, J. (2013). Hippocampus and striatum: dynamics and interaction during acquisition and sleep-related motor sequence memory consolidation. *Hippocampus*, 23(11), 985-1004. <http://doi.org/10.1002/hipo.22183>.

Amin, H. y Malik, A. S. (2013). Human memory retention and recall processes. a review of EEG and fMRI studies. *Neurosciences*, 18(4), 330-344.

Angelova, P. R. y Abramov, A. Y. (2018). Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration. *FEBS Letters*, 592(5), 692-702. <http://doi.org/10.1002/1873-3468.12964>.

Asok, A., Leroy, F., Rayman, J. B. y Kandel, E. R. (2019). Molecular mechanisms of the memory trace. *Trends in Neurosciences*, 42(1), 14-22. <http://doi.org/10.1016/j.tins.2018.10.005>.

Bábel, P. (2020). Operant conditioning as a new mechanism of placebo effects. *European Journal of Pain*, 24(5), 902-908. <http://doi.org/10.1002/ejp.1544>.

Baldi, E., Lorenzini, C. A. y Corrado, B. (2003). Task solving by procedural strategies in the Morris water maze. *Physiology and Behavior*, 78(4-5), 785–793. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(03\)00064-7](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(03)00064-7).

Basile, G. A., Bertino, S., Bramanti, A., Ciurleo, R., Anastasi, G. P., Milardi, D. y Cacciola, A. (2021). Striatal topographical organization: bridging the gap between molecules, connectivity and behavior. *European Journal of Histochemistry*, 65(s1). <http://doi.org/10.4081/ejh.2021.3284>.

Batterink, L. J., Paller, K. A. y Reber, P. J. (2019). Understanding the neural bases of implicit and statistical learning. *Topics in Cognitive Science*, 11(3), 482-503. <http://doi.org/10.1111/tops.12420>.

Berger, T., Song, D., Chan, R., Shin, D., Marmarelis, V., Hampson, R., Sweatt, A., Heck, C., Liu, C., Wills, J., Lacoss, J., Granacki, J., Gerhardt, G. y Deadwyler, S. (2012). Role of the hippocampus in memory formation: restorative encoding memory integration neural device as a cognitive neural prosthesis. *IEEE Pulse*, 3(5), 17-22. <http://doi.org/10.1109/mpul.2012.2205775>.

Bhat, A. H., Dar, K. B., Anees, S., Zargar, M. A., Masood, A., Sofi, M. A. y Ganie, S. A. (2015). Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 74, 101-110. <http://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.07.025>.

Bisbal, M., Remedi, M., Quassollo, G., Cáceres, A. y Sanchez, M. (2018). Rotenone inhibits axonogenesis via an Lfc/RhoA/ROCK pathway in cultured hippocampal neurons. *Journal of Neurochemistry*, 146(5), 570–584. <https://doi.org/10.1111/jnc.14547>.

Bittner, C. X., Loaiza, A., Ruminot, I., Larenas, V., Sotelo-Hitschfeld, T., Gutiérrez, R., Córdova, A., Valdebenito, R., Frommer, W. B. y Barros, L. F. (2010). High resolution measurement of the glycolytic rate. *Frontiers in Neuroenergetics*, 2, 26. <https://doi.org/10.3389/fnene.2010.00026>.

Bolam, J. P., Hanley, J. J., Booth, P. A. y Bevan, M. D. (2000). Synaptic organisation of the basal ganglia. *Journal of Anatomy*, 196 (Pt 4)(Pt 4), 527-542. <http://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2000.19640527.x>.

Bosch-Bouju, C., Hyland, B. I. y Parr-Brownlie, L. C. (2013). Motor thalamus integration of cortical, cerebellar and basal ganglia information: implications for normal and parkinsonian conditions. *Frontiers in Computational Neuroscience*, 7, 163. <http://doi.org/10.3389/fncom.2013.00163>.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254. <http://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.

Callaway, N. L., Riha, P. D., Bruchey, A. K., Munshi, Z. y Gonzalez-Lima, F. (2004). Methylene blue improves brain oxidative metabolism and memory retention in rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 77(1), 175-181. <http://doi.org/10.1016/j.pbb.2003.10.007>.

Cheng, A., Hou, Y. y Mattson, M. P. (2010). Mitochondria and neuroplasticity. *ASN Neuro*, 2(5), e00045. <http://doi.org/10.1042/an20100019>.

Chia, C. y Otto, T. (2013). Hippocampal Arc (Arg3.1) expression is induced by memory recall and required for memory reconsolidation in trace fear conditioning. *Neurobiology of Learning and Memory*, 106, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.06.021>.

Choi, G. E., Oh, J. Y., Lee, H. J., Chae, C. W., Kim, J. S., Jung, Y. H. y Han, H. J. (2018). Glucocorticoid-mediated ER-mitochondria contacts reduce AMPA receptor and mitochondria trafficking into cell terminus via microtubule destabilization. *Cell Death & Disease*, 9(11), 1137. <http://doi.org/10.1038/s41419-018-1172-y>.

Chrousos, G. P. (2009). Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews*, 5(7), 374–381. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2009.106>.

Chung, S., Son, G. H. y Kim, K. (2011). Circadian rhythm of adrenal glucocorticoid: its regulation and clinical implications. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1812(5), 581–591. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.02.003>.

Daberkow, D. P., Riedy, M. D., Kesner, R. P. y Keefe, K. A. (2007). Arc mRNA induction in striatal efferent neurons associated with response learning. *The European Journal of Neuroscience*, 26(1), 228–241. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05630.x>.

- Das, S.,** Lituma, P. J., Castillo, P. E. y Singer, R. H. (2023). Maintenance of a short-lived protein required for long-term memory involves cycles of transcription and local translation. *Neuron*, 111(13), 2051–2064.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2023.04.005>.
- David, G. y Barrett, E. F. (2003).** Mitochondrial Ca²⁺ uptake prevents desynchronization of quantal release and minimizes depletion during repetitive stimulation of mouse motor nerve terminals. *The Journal of Physiology*, 548(Pt 2), 425-438. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.035196>.
- Davies, K. L.,** Smith, D. J., El-Bacha, T., Wooding, P. F. P., Forhead, A. J., Murray, A. J., Fowden, A. L. y Camm, E. J. (2022). Cortisol regulates cerebral mitochondrial oxidative phosphorylation and morphology of the brain in a region-specific manner in the ovine fetus. *Biomolecules*, 12(6), 768. <https://doi.org/10.3390/biom12060768>.
- de Kloet, E. R.,** Meijer, O. C., de Nicola, A. F., de Rijk, R. H. y Joëls, M. (2018). Importance of the brain corticosteroid receptor balance in metaplasticity, cognitive performance and neuro-inflammation. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 49, 124–145. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2018.02.003>.
- Devine, M. J. y Kittler, J. T. (2018).** Mitochondria at the neuronal presynapse in health and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 19(2), 63-80. <http://doi.org/10.1038/nrn.2017.170>.
- Di Maio, V. (2008).** Regulation of information passing by synaptic transmission: a short review. *Brain Research*, 1225, 26-38. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.06.016>.
- Doyon, J. (2008).** Motor sequence learning and movement disorders. *Current Opinion in Neurology*, 21(4), 478-483. <http://doi.org/10.1097/WCO.0b013e328304b6a3>.
- Du, J.,** Wang, Y., Hunter, R., Wei, Y., Blumenthal, R., Falke, C., Khairova, R., Zhou, R., Yuan, P., Machado-Vieira, R., McEwen, B. S. y Manji, H. K. (2009). Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(9), 3543-3548. <http://doi.org/10.1073/pnas.0812671106>.

- Dudai, Y. (2004).** The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annual Review of Psychology*, *55*, 51-86. <http://doi.org/10.1146/annurev.psych.55.090902.142050>.
- Dudai, Y. (2012).** The restless engram: consolidations never end. *Annual Review of Neuroscience*, *35*, 227-247. <http://doi.org/10.1146/annurev-neuro-062111-150500>.
- Dudai, Y., Karni, A. y Born, J. (2015).** The consolidation and transformation of memory. *Neuron*, *88*(1), 20-32. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.004>.
- Dudai, Y. y Morris, R. G. (2013).** Memorable trends. *Neuron*, *80*(3), 742-750. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.09.039>.
- Dudai, Y. y Morris, R. (2000).** To consolidate or not to consolidate: what are the questions? In *Brain, Perception, Memory: Advances in Cognitive Neuroscience* (pp. 149-162). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198524823.003.0011>.
- Eisner, V., Picard, M. y Hajnóczky, G. (2018).** Mitochondrial dynamics in adaptive and maladaptive cellular stress responses. *Nature Cell Biology*, *20*(7), 755-765. <http://doi.org/10.1038/s41556-018-0133-0>.
- Epstein, I. y Finkbeiner, S. (2018).** The Arc of cognition: signaling cascades regulating Arc and implications for cognitive function and disease. In *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *77*, 63–72. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.09.023>.
- Ertürk, A., Wang, Y. y Sheng, M. (2014).** Local pruning of dendrites and spines by caspase-3-dependent and proteasome-limited mechanisms. *The Journal of Neuroscience*, *34*(5), 1672-1688. <http://doi.org/10.1523/jneurosci.3121-13.2014>.
- Esteras, N., Kopach, O., Maiolino, M., Lariccia, V., Amoroso, S., Qamar, S., Wray, S., Rusakov, D. A., Jaganjac, M. y Abramov, A. Y. (2022).** Mitochondrial ROS control neuronal excitability and cell fate in frontotemporal dementia. *Alzheimer's & Dementia*, *18*(2), 318-338. <http://doi.org/10.1002/alz.12394>.
- Ferbinteanu, J. (2019).** Memory systems 2018 - towards a new paradigm. *Neurobiology of Learning and Memory*, *157*, 61-78. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.11.005>.

Finkel, T. y Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239-247. <http://doi.org/10.1038/35041687>.

Frankland, P. W., Josselyn, S. A. y Köhler, S. (2019). The neurobiological foundation of memory retrieval. *Nature Neuroscience*, 22(10), 1576-1585. <http://doi.org/10.1038/s41593-019-0493-1>.

Fuentes-Ibañez, A., Siller-Pérez, C., Serafín, N., Prado-Alcalá, R. A., Roozendaal, B. y Quirarte, G. L. (2021). Corticosterone in the dorsolateral striatum facilitates the extinction of stimulus-response memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 183, 107481. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2021.107481>.

Fujita, C., Ichikawa, F., Teratani, T., Murakami, G., Okada, T., Shinohara, M., Kawato, S. y Ohta, Y. (2009). Direct effects of corticosterone on ATP production by mitochondria from immortalized hypothalamic GT1-7 neurons. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 117(1-3), 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2009.07.002>.

Gardner, R. S., Gold, P. E. y Korol, D. L. (2020). Inactivation of the striatum in aged rats rescues their ability to learn a hippocampus-sensitive spatial navigation task. *Neurobiology of Learning and Memory*, 172, 107231. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2020.107231>.

Gardner, R. S., Suarez, D. F., Robinson-Burton, N. K., Rudnický, C. J., Gulati, A., Ascoli, G. A. y Dumas, T. C. (2016). Differential Arc expression in the hippocampus and striatum during the transition from attentive to automatic navigation on a plus maze. *Neurobiology of Learning and Memory*, 131, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.03.008>.

Gasbarri, A., Pompili, A., Packard, M. G. y Tomaz, C. (2014). Habit learning and memory in mammals: behavioral and neural characteristics. *Neurobiology of Learning and Memory*, 114, 198-208. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.06.010>.

Gibbs, M. E. y Ng, K. T. (1984). Dual action of cycloheximide on memory formation in day-old chicks. *Behavioural Brain Research*, 12(1), 21-27. [http://doi.org/10.1016/0166-4328\(84\)90199-2](http://doi.org/10.1016/0166-4328(84)90199-2).

Gonzales, K. K. y Smith, Y. (2015). Cholinergic interneurons in the dorsal and ventral striatum: anatomical and functional considerations in normal and diseased conditions.

Annals of the New York Academy of Sciences, 1349(1), 1-45.
<http://doi.org/10.1111/nyas.12762>.

Goodman, J. y Packard, M. G. (2014). Peripheral and intra-dorsolateral striatum injections of the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 impair consolidation of stimulus-response memory. *Neuroscience*, 274, 128–137.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.05.007>.

Goodman, J. y Packard, M. G. (2018). The role of the dorsal striatum in extinction: a memory systems perspective. *Neurobiology of Learning and Memory*, 150, 48-55.
<http://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.02.028>.

Guskjolen, A. y Cembrowski, M. S. (2023). Engram neurons: encoding, consolidation, retrieval, and forgetting of memory. *Molecular Psychiatry*.
<http://doi.org/10.1038/s41380-023-02137-5>.

Guzowski, J. F., Lyford, G. L., Stevenson, G. D., Houston, F. P., McGaugh, J. L., Worley, P. F., & Barnes, C. A. (2000). Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *The Journal of Neuroscience*, 20(11), 3993–4001. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-11-03993.2000>.

Haber, S. N. (2016). Corticostriatal circuitry. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 18(1), 7-21. <http://doi.org/10.31887/DCNS.2016.18.1/shaber>.

Harris, J. J., Jolivet, R. y Attwell, D. (2012). Synaptic energy use and supply. *Neuron*, 75(5), 762-777. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.019>.

Henke, K. (2010). A model for memory systems based on processing modes rather than consciousness. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(7), 523-532.
<http://doi.org/10.1038/nrn2850>.

Hollenbeck, P. J. y Saxton, W. M. (2005). The axonal transport of mitochondria. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 23), 5411-5419. <http://doi.org/10.1242/jcs.02745>.

Hunter, R. G., Seligsohn, M., Rubin, T. G., Griffiths, B. B., Ozdemir, Y., Pfaff, D. W., Datson, N. A. y McEwen, B. S. (2016). Stress and corticosteroids regulate rat hippocampal mitochondrial DNA gene expression via the glucocorticoid receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(32), 9099–9104. <https://doi.org/10.1073/pnas.1602185113>.

Ibarra-Gutiérrez, M. T., Serrano-García, N. y Orozco-Ibarra, M. (2023). Rotenone-induced model of Parkinson's disease: beyond, mitochondrial complex I inhibition. *Molecular Neurobiology*, 60(4), 1929-1948. <http://doi.org/10.1007/s12035-022-03193-8>.

Innos, J. y Hickey, M. A. (2021). Using rotenone to model Parkinson's disease in mice: a review of the role of pharmacokinetics. *Chemical Research in Toxicology*, 34(5), 1223–1239. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.0c00522>.

Izquierdo, I., Bevilaqua, L. R., Rossato, J. I., Bonini, J. S., Da Silva, W. C., Medina, J. H. y Cammarota, M. (2006). The connection between the hippocampal and the striatal memory systems of the brain: a review of recent findings. *Neurotoxicity Research*, 10(2), 113-121. <http://doi.org/10.1007/bf03033240>.

Izquierdo, I., Furini, C. R. y Myskiw, J. C. (2016). Fear Memory. *Physiological Reviews*, 96(2), 695–750. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2015>.

Jang, W., Kim, H. J., Li, H., Jo, K. D., Lee, M. K. y Yang, H. O. (2016). The neuroprotective effect of erythropoietin on rotenone-Induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells through the induction of autophagy. *Molecular Neurobiology*, 53(6), 3812–3821. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9316-x>.

Josselyn, S. A. y Tonegawa, S. (2020). Memory engrams: recalling the past and imagining the future. *Science*, 367(6473). <http://doi.org/10.1126/science.aaw4325>.

Katyare, S. S., Balasubramanian, S. y Parmar, D. V. (2003). Effect of corticosterone treatment on mitochondrial oxidative energy metabolism in developing rat brain. *Experimental Neurology*, 183(1), 241-248. [http://doi.org/10.1016/s0014-4886\(03\)00176-6](http://doi.org/10.1016/s0014-4886(03)00176-6).

Kandel, E. R. (2021). *Principles of Neural Science* (6th ed.). McGraw-Hill Education.

Kimura, R., Ma, L. Y., Wu, C., Turner, D., Shen, J. X., Ellsworth, K., Wakui, M., Maalouf, M. y Wu, J. (2012). Acute exposure to the mitochondrial complex I toxin rotenone impairs synaptic long-term potentiation in rat hippocampal slices. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 18(8), 641-646. <http://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2012.00337.x>.

Klann, E. (1998). Cell-permeable scavengers of superoxide prevent long-term potentiation in hippocampal area CA1. *Journal of Neurophysiology*, 80(1), 452-457. <http://doi.org/10.1152/jn.1998.80.1.452>.

Klier, C. y Buratto, L. G. (2020). Stress and long-term memory retrieval: a systematic review. *Trends in Psychiatry and Psychotherapy*, 42(3), 284–291. <https://doi.org/10.1590/2237-6089-2019-0077>.

Kokkinopoulou, I. y Moutsatsou, P. (2021). Mitochondrial glucocorticoid receptors and their actions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11). <http://doi.org/10.3390/ijms22116054>.

Kreitzer, A. C. y Malenka, R. C. (2008). Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron*, 60(4), 543-554. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.11.005>.

Kwon, S. K., Sando, R., 3rd, Lewis, T. L., Hirabayashi, Y., Maximov, A. y Polleux, F. (2016). LKB1 regulates mitochondria-dependent presynaptic calcium clearance and neurotransmitter release properties at excitatory synapses along cortical axons. *PLoS Biology*, 14(7), e1002516. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002516>.

Li, Z., Okamoto, K., Hayashi, Y. y Sheng, M. (2004). The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell*, 119(6), 873-887. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.003>.

Liljeholm, M. y O'Doherty, J. P. (2012). Contributions of the striatum to learning, motivation, and performance: an associative account. *Trends in Cognitive Sciences*, 16(9), 467-475. <http://doi.org/10.1016/j.tics.2012.07.007>.

Lipton, D. M., Gonzales, B. J. y Citri, A. (2019). Dorsal striatal circuits for habits, compulsions and addictions. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 13, 28. <http://doi.org/10.3389/fnsys.2019.00028>.

Liu, D., Zhang, Y., Gharavi, R., Park, H. R., Lee, J., Siddiqui, S., Telljohann, R., Nassar, M. R., Cutler, R. G., Becker, K. G. y Mattson, M. P. (2015). The mitochondrial uncoupler DNP triggers brain cell mTOR signaling network reprogramming and CREB pathway up-regulation. *Journal of Neurochemistry*, 134(4), 677–692. <https://doi.org/10.1111/jnc.13176>.

- López-Doménech, G. y Kittler, J. T. (2023).** Mitochondrial regulation of local supply of energy in neurons. *Current Opinion in Neurobiology*, *81*, 102747. <http://doi.org/10.1016/j.conb.2023.102747>.
- Lozano, Y. R., Serafín, N., Prado-Alcalá, R. A., Roozendaal, B. y Quirarte, G. L. (2013).** Glucocorticoids in the dorsomedial striatum modulate the consolidation of spatial but not procedural memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, *101*, 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.01.001>.
- Malvaez, M. y Wassum, K. M. (2018).** Regulation of habit formation in the dorsal striatum. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, *20*, 67-74. <http://doi.org/10.1016/j.cobeha.2017.11.005>.
- Mamiya, N., Fukushima, H., Suzuki, A., Matsuyama, Z., Homma, S., Frankland, P. W. y Kida, S. (2009).** Brain region-specific gene expression activation required for reconsolidation and extinction of contextual fear memory. *The Journal of Neuroscience*, *29*(2), 402–413. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4639-08.2009>.
- Mattson, M. P., Gleichmann, M. y Cheng, A. (2008).** Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. *Neuron*, *60*(5), 748-766. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.010>.
- Mayford, M., Siegelbaum, S. A. y Kandel, E. R. (2012).** Synapses and memory storage. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(6). <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a005751>.
- Mazat, J. P., Ransac, S., Heiske, M., Devin, A., & Rigoulet, M. (2013).** Mitochondrial energetic metabolism-some general principles. *IUBMB Life*, *65*(3), 171–179. <https://doi.org/10.1002/iub.1138>.
- McBride, H. M., Neuspiel, M. y Wasiak, S. (2006).** Mitochondria: more than just a powerhouse. *Current Biology*, *16*(14), R551-560. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2006.06.054>.
- McDonald, R. J. y White, N. M. (1993).** A triple dissociation of memory systems: hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. *Behavioral Neuroscience*, *107*(1), 3-22. <http://doi.org/10.1037//0735-7044.107.1.3>.
- McDonald, R. J. y White, N. M. (1994).** Parallel information processing in the water maze: evidence for independent memory systems involving dorsal striatum and

hippocampus. *Behavioral and Neural Biology*, 61(3), 260-270. [http://doi.org/10.1016/s0163-1047\(05\)80009-3](http://doi.org/10.1016/s0163-1047(05)80009-3).

McGaugh, J. L. (2000). Memory a century of consolidation. *Science*, 287(5451), 248-251. <http://doi.org/10.1126/science.287.5451.248>.

Medina, A. C., Charles, J. R., Espinoza-González, V., Sánchez-Resendis, O., Prado-Alcalá, R. A., Roozendaal, B. y Quirarte, G. L. (2007). Glucocorticoid administration into the dorsal striatum facilitates memory consolidation of inhibitory avoidance training but not of the context or footshock components. *Learning & Memory*, 14(10), 673–677. <https://doi.org/10.1101/lm.654407>.

Meijer, O. C., Koorneef, L. L. y Kroon, J. (2018). Glucocorticoid receptor modulators. *Annales d'Endocrinologie*, 79(3), 107–111. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2018.03.004>.

Messaoudi, E., Kanhema, T., Soulé, J., Tiron, A., Dageyte, G., da Silva, B. y Bramham, C. R. (2007). Sustained Arc/Arg3.1 synthesis controls long-term potentiation consolidation through regulation of local actin polymerization in the dentate gyrus in vivo. *The Journal of Neuroscience*, 27(39), 10445–10455. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2883-07.2007>.

Misgeld, T. y Schwarz, T. L. (2017). Mitostasis in neurons: maintaining mitochondria in an extended cellular architecture. *Neuron*, 96(3), 651-666. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.09.055>.

Minatohara, K., Akiyoshi, M. y Okuno, H. (2016). Role of immediate-early genes in synaptic plasticity and neuronal ensembles underlying the memory trace. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 8, 78. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00078>.

Miura, K. y Sladoje, N. (2020). *Bioimage data analysis workflows*. Springer. <http://doi.org/10.1007/978-3-030-22386-1>.

Miyoshi, E., Wietzikoski, E. C., Bortolanza, M., Boschen, S. L., Canteras, N. S., Izquierdo, I. y Da Cunha, C. (2012). Both the dorsal hippocampus and the dorsolateral striatum are needed for rat navigation in the Morris water maze. *Behavioural and Brain Research*, 226(1), 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.09.011>.

- Morris, R. (1984).** Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 11(1), 47–60. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(84\)90007-4](https://doi.org/10.1016/0165-0270(84)90007-4).
- Morin, C., Zini, R., Simon, N., Charbonnier, P., Tillement, J. P. y Le Louet, H. (2000).** Low glucocorticoid concentrations decrease oxidative phosphorylation of isolated rat brain mitochondria: an additional effect of dexamethasone. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 14(5), 493-500. <http://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2000.tb00432.x>.
- Mu, S., OuYang, L., Liu, B., Zhu, Y., Li, K., Zhan, M., Liu, Z., Jia, Y. y Lei, W. (2011).** Protective effect of melatonin on 3-NP induced striatal interneuron injury in rats. *Neurochemistry International*, 59(2), 224-234. <http://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.05.009>.
- Mulcahy, P., Walsh, S., Paucard, A., Rea, K. y Dowd, E. (2011).** Characterisation of a novel model of Parkinson's disease by intra-striatal infusion of the pesticide rotenone. *Neuroscience*, 181, 234-242. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.01.038>.
- Munnich, A., Rötig, A., Chretien, D., Saudubray, J. M., Cormier, V. y Rustin, P. (1996).** Clinical presentations and laboratory investigations in respiratory chain deficiency. *European Journal of Pediatrics*, 155(4), 262–274. <https://doi.org/10.1007/BF02002711>.
- Nader, K., Schafe, G. E. y LeDoux, J. E. (2000).** The labile nature of consolidation theory. *Nature Reviews Neuroscience*, 1(3), 216-219. <http://doi.org/10.1038/35044580>.
- Nakayama, D., Iwata, H., Teshirogi, C., Ikegaya, Y., Matsuki, N. y Nomura, H. (2015).** Long-delayed expression of the immediate early gene *Arc/Arg3.1* refines neuronal circuits to perpetuate fear memory. *The Journal of Neuroscience*, 35(2), 819–830. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2525-14.2015>.
- National Research Council. (2011).** *Guide for the care and use of laboratory animals* (8th ed.). National Academy of Sciences.
- O'Doherty, J. P., Cockburn, J. y Pauli, W. M. (2017).** Learning, reward, and decision making. *Annual Review of Psychology*, 68, 73-100. <http://doi.org/10.1146/annurev-psych-010416-044216>.

O'Dowd, B. S., Gibbs, M. E., Sedman, G. L. y Ng, K. T. (1994). Astrocytes implicated in the energizing of intermediate memory processes in neonate chicks. *Cognitive Brain Research*, 2(2), 93-102. [http://doi.org/10.1016/0926-6410\(94\)90006-x](http://doi.org/10.1016/0926-6410(94)90006-x).

O'Keefe, J. y Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map: preliminary evidence from unit activity in the freely moving rat. *Brain Research*, 34, 171-175. [http://doi.org/10.1016/0006-8993\(71\)90358-1](http://doi.org/10.1016/0006-8993(71)90358-1).

O'Keefe, J. y Nadel, L. (1979). Précis of O'Keefe & Nadel's The hippocampus as a cognitive map. *Behavioral and Brain Sciences*, 2(4), 487-494. <http://doi.org/10.1017/S0140525X00063949>.

Obashi, K. y Okabe, S. (2013). Regulation of mitochondrial dynamics and distribution by synapse position and neuronal activity in the axon. *The European Journal of Neuroscience*, 38(3), 2350-2363. <http://doi.org/10.1111/ejn.12263>.

Okano, H., Hirano, T. y Balaban, E. (2000). Learning and memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(23), 12403-12404. <http://doi.org/10.1073/pnas.210381897>.

Oswald, M. C. W., Garnham, N., Sweeney, S. T. y Landgraf, M. (2018). Regulation of neuronal development and function by ROS. *FEBS Letters*, 592(5), 679-691. <http://doi.org/10.1002/1873-3468.12972>.

Othman, M. Z., Hassan, Z. y Che Has, A. T. (2022). Morris water maze: a versatile and pertinent tool for assessing spatial learning and memory. *Experimental Animals*, 71(3), 264-280. <http://doi.org/10.1538/expanim.21-0120>.

Packard, M. G. (1999). Glutamate infused posttraining into the hippocampus or caudate-putamen differentially strengthens place and response learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(22), 12881-12886. <http://doi.org/10.1073/pnas.96.22.12881>.

Padamsey, Z. y Rochefort, N. L. (2023). Paying the brain's energy bill. *Current Opinion in Neurobiology*, 78, 102668. <http://doi.org/10.1016/j.conb.2022.102668>.

Paul-Gilloteaux, P., Tosi, S., Hériché, J. K., Gaignard, A., Ménager, H., Marée, R., Baecker, V., Klemm, A., Kalaš, M., Zhang, C., Miura, K. y Colombelli, J. (2021). Bioimage analysis workflows: community resources to navigate through a complex ecosystem. *F1000Research*, 10, 320. <http://doi.org/10.12688/f1000research.52569.1>.

Paul, C. A., Beltz, B. y Berger-Sweeney, J. (2008). The nissl stain: a stain for cell bodies in brain sections. *CSH Protocols*, 2008, pdb prot4805. <http://doi.org/10.1101/pdb.prot4805>.

Paxinos, G. y Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (6th ed.). Academic Press.

Peak, J., Hart, G. y Balleine, B. W. (2019). From learning to action: the integration of dorsal striatal input and output pathways in instrumental conditioning. *The European Journal of Neuroscience*, 49(5), 658-671. <http://doi.org/10.1111/ejn.13964>.

Plath, N., Ohana, O., Dammermann, B., Errington, M. L., Schmitz, D., Gross, C., Mao, X., Engelsberg, A., Mahlke, C., Welzl, H., Kobalz, U., Stawrakakis, A., Fernandez, E., Waltereit, R., Bick-Sander, A., Therstappen, E., Cooke, S. F., Blanquet, V., Wurst, W., Salmen, B., ... Kuhl, D. (2006). Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron*, 52(3), 437–444. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.08.024>.

Ploski, J. E., Pierre, V. J., Smucny, J., Park, K., Monsey, M. S., Overeem, K. A., & Schafe, G. E. (2008). The activity-regulated cytoskeletal-associated protein (Arc/Arg3.1) is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning in the lateral amygdala. *The Journal of Neuroscience*, 28(47), 12383–12395. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1662-08.2008>.

Quirarte, G. L., de la Teja, I. S., Casillas, M., Serafín, N., Prado-Alcalá, R. A. y Roozendaal, B. (2009). Corticosterone infused into the dorsal striatum selectively enhances memory consolidation of cued water-maze training. *Learning & Memory*, 16(10), 586-589. <http://doi.org/10.1101/lm.1493609>.

Radad, K., Rausch, W. D. y Gille, G. (2006). Rotenone induces cell death in primary dopaminergic culture by increasing ROS production and inhibiting mitochondrial respiration. *Neurochemistry International*, 49(4), 379–386. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2006.02.003>.

Ramírez-Amaya, V., Vazdarjanova, A., Mikhael, D., Rosi, S., Worley, P. F. y Barnes, C. A. (2005). Spatial exploration-induced Arc mRNA and protein expression: evidence for selective, network-specific reactivation. *The Journal of Neuroscience*, 25(7), 1761–1768. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4342-04.2005>.

Reber, P. J. (2008). Cognitive neuroscience of declarative and nondeclarative memory. *Advances in Psychology*, 139, 113-123. [http://doi.org/10.1016/S0166-4115\(08\)10010-3](http://doi.org/10.1016/S0166-4115(08)10010-3).

Reber, P. J. (2013). The neural basis of implicit learning and memory: a review of neuropsychological and neuroimaging research. *Neuropsychologia*, 51(10), 2026-2042. <http://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2013.06.019>.

Riha, P. D., Bruchey, A. K., Echevarria, D. J. y Gonzalez-Lima, F. (2005). Memory facilitation by methylene blue: dose-dependent effect on behavior and brain oxygen consumption. *European Journal of Pharmacology*, 511(2-3), 151-158. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.02.001>.

Rogers, L. K. (2020). Cellular targets of oxidative stress. *Current Opinion in Toxicology*, 20, 48-54. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2020.05.002>.

Rojas, J. C., Bruchey, A. K. y Gonzalez-Lima, F. (2012). Neurometabolic mechanisms for memory enhancement and neuroprotection of methylene blue. *Progress in Neurobiology*, 96(1), 32-45. <http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.10.007>.

Roosendaal, B. (2000). 1999 Curt P. Richter award. Glucocorticoids and the regulation of memory consolidation. *Psychoneuroendocrinology*, 25(3), 213–238. [https://doi.org/10.1016/s0306-4530\(99\)00058-x](https://doi.org/10.1016/s0306-4530(99)00058-x).

Roosendaal, B. (2002). Stress and memory: opposing effects of glucocorticoids on memory consolidation and memory retrieval. *Neurobiology of Learning and Memory*, 78(3), 578–595. <https://doi.org/10.1006/nlme.2002.4080>.

Roosendaal, B. y McGaugh, J. L. (2011). Memory modulation. *Behavioral Neuroscience*, 125(6), 797-824. <http://doi.org/10.1037/a0026187>.

Roubertoux, P. L., Sluyter, F., Carlier, M., Marcet, B., Maarouf-Veray, F., Chérif, C., Marican, C., Arrechi, P., Godin, F., Jamon, M., Verrier, B. y Cohen-Salmon, C. (2003). Mitochondrial DNA modifies cognition in interaction with the nuclear genome and age in mice. *Nature Genetics*, 35(1), 65-69. <http://doi.org/10.1038/ng1230>.

Ryan, T. J. y Frankland, P. W. (2022). Forgetting as a form of adaptive engram cell plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*, 23(3), 173-186. <http://doi.org/10.1038/s41583-021-00548-3>.

Sánchez-Resendis, O., Medina, A. C., Serafín, N., Prado-Alcalá, R. A., Roozendaal, B. y Quirarte, G. L. (2012). Glucocorticoid-cholinergic interactions in the dorsal striatum in memory consolidation of inhibitory avoidance training. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 6, 33. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2012.00033>.

Sandi, C. (2003). Implicación de los glucocorticoides en la consolidación de la memoria. *Revista de Neurología*, 37(9), 843-848.

Schönfeld, P. y Reiser, G. (2013). Why does brain metabolism not favor burning of fatty acids to provide energy? reflections on disadvantages of the use of free fatty acids as fuel for brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 33(10), 1493-1499. <http://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.128>.

Schwabe, L., Hermans, E. J., Joëls, M. y Roozendaal, B. (2022). Mechanisms of memory under stress. *Neuron*, 110(9), 1450-1467. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.02.020>.

Scoville, W. B. y Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 20(1), 11-21. <http://doi.org/10.1136/jnnp.20.1.11>.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SADER). (2001). **NOM-062-ZOO-1999:** Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Ciudad de México: SADER.

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). (2003). **NOM-087-ECOL-SSA1-2002.** Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. Ciudad de México: SEMARNAT.

Sehgal, M., Song, C., Ehlers, V. L. y Moyer, J. R., Jr. (2013). Learning to learn - intrinsic plasticity as a metaplasticity mechanism for memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 105, 186-199. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.07.008>.

Sharma, S., Kumar, P. y Deshmukh, R. (2018). Neuroprotective potential of spermidine against rotenone induced Parkinson's disease in rats. *Neurochemistry International*, 116, 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.02.010>.

Sharma, V. K., Singh, T. G. y Mehta, V. (2021). Stressed mitochondria: a target to intrude alzheimer's disease. *Mitochondrion*, 59, 48-57. <http://doi.org/10.1016/j.mito.2021.04.004>.

Sheng, Z. H. (2017). The interplay of axonal energy homeostasis and mitochondrial trafficking and anchoring. *Trends in Cell Biology*, 27(6), 403-416. <http://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.01.005>.

Shirazi, S. N., Friedman, A. R., Kaufer, D. y Sakhai, S. A. (2015). Glucocorticoids and the brain: neural mechanisms regulating the stress response. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 872, 235–252. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2895-8_10.

Siller-Pérez, C., Serafín, N., Prado-Alcalá, R. A., Roozendaal, B. y Quirarte, G. L. (2017). Glucocorticoid administration into the dorsolateral but not dorsomedial striatum accelerates the shift from a spatial toward procedural memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 141, 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2017.03.020>.

Smeitink, J. A., van den Heuvel, L. W., Koopman, W. J., Nijtmans, L. G., Ugalde, C. y Willems, P. H. (2004). Cell biological consequences of mitochondrial NADH: ubiquinone oxidoreductase deficiency. *Current Neurovascular Research*, 1(1), 29–40. <https://doi.org/10.2174/1567202043480224>.

Spinelli, J. B. y Haigis, M. C. (2018). The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nature Cell Biology*, 20(7), 745-754. <http://doi.org/10.1038/s41556-018-0124-1>.

Squire, L. R. (2004). Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory*, 82(3), 171-177. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2004.06.005>.

Squire, L. R. y Dede, A. J. (2015). Conscious and unconscious memory systems. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(3), a021667. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a021667>.

Squire, L. R., Genzel, L., Wixted, J. T. y Morris, R. G. (2015). Memory consolidation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(8), a021766. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a021766>.

Sutherland, G. R. y **McNaughton**, B. (2000). Memory trace reactivation in hippocampal and neocortical neuronal ensembles. *Current Opinion in Neurobiology*, 10(2), 180-186. [http://doi.org/10.1016/s0959-4388\(00\)00079-9](http://doi.org/10.1016/s0959-4388(00)00079-9).

Takehara-Nishiuchi, K. (2021). Neurobiology of systems memory consolidation. *The European Journal of Neuroscience*, 54(8), 6850-6863. <http://doi.org/10.1111/ejn.14694>.

Thiels, E., **Urban**, N. N., **Gonzalez-Burgos**, G. R., **Kanterewicz**, B. I., **Barrionuevo**, G., **Chu**, C. T., **Oury**, T. D. y **Klann**, E. (2000). Impairment of long-term potentiation and associative memory in mice that overexpress extracellular superoxide dismutase. *The Journal of Neuroscience*, 20(20), 7631-7639. <http://doi.org/10.1523/jneurosci.20-20-07631.2000>.

Tonegawa, S., **Morrissey**, M. D. y **Kitamura**, T. (2018). The role of engram cells in the systems consolidation of memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 19(8), 485-498. <http://doi.org/10.1038/s41583-018-0031-2>.

Tonegawa, S., **Pignatelli**, M., **Roy**, D. S. y **Ryan**, T. J. (2015). Memory engram storage and retrieval. *Current Opinion in Neurobiology*, 35, 101-109. <http://doi.org/10.1016/j.conb.2015.07.009>.

Upadhyay, S., **Yedke**, N. G., **Rahi**, V., **Singh**, S., **Kumar**, S., **Arora**, A., **Chandolia**, P., **Kaur**, P., **Kumar**, M., **Koshal**, P., **Jamwal**, S. y **Kumar**, P. (2023). An overview of the pathophysiological mechanisms of 3-nitropropionic acid (3-NPA) as a neurotoxin in a Huntington's disease model and its relevance to drug discovery and development. *Neurochemical Research*, 48(6), 1631-1647. <http://doi.org/10.1007/s11064-023-03868-1>.

Verstreken, P., **Ly**, C. V., **Venken**, K. J., **Koh**, T. W., **Zhou**, Y. y **Bellen**, H. J. (2005). Synaptic mitochondria are critical for mobilization of reserve pool vesicles at *Drosophila* neuromuscular junctions. *Neuron*, 47(3), 365-378. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.06.018>.

Vilchez, D., **Ros**, S., **Cifuentes**, D., **Pujadas**, L., **Vallès**, J., **García-Fojeda**, B., **Criado-García**, O., **Fernández-Sánchez**, E., **Medraño-Fernández**, I., **Domínguez**, J., **García-Rocha**, M., **Soriano**, E., **Rodríguez de Córdoba**, S. y **Guinovart**, J. J. (2007). Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive

myoclonus epilepsy. *Nature Neuroscience*, 10(11), 1407-1413. <http://doi.org/10.1038/nn1998>.

Wall, M. J., Collins, D. R., Chery, S. L., Allen, Z. D., Pastuzyn, E. D., George, A. J., Nikolova, V. D., Moy, S. S., Philpot, B. D., Shepherd, J. D., Müller, J., Ehlers, M. D., Mabb, A. M. y Corrêa, S. A. L. (2018). The temporal dynamics of Arc expression regulate cognitive flexibility. *Neuron*, 98(6), 1124–1132.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.05.012>.

Walters, G. C. y Usachev, Y. M. (2023). Mitochondrial calcium cycling in neuronal function and neurodegeneration. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11, 1094356. <http://doi.org/10.3389/fcell.2023.1094356>.

Wei, Y. H., Lu, C. Y., Wei, C. Y., Ma, Y. S. y Lee, H. C. (2001). Oxidative stress in human aging and mitochondrial disease-consequences of defective mitochondrial respiration and impaired antioxidant enzyme system. *The Chinese Journal of Physiology*, 44(1), 1-11.

Williams, M. T., Morford, L. L., Wood, S. L., Wallace, T. L., Fukumura, M., Broening, H. W. y Vorhees, C. V. (2003). Developmental D-methamphetamine treatment selectively induces spatial navigation impairments in reference memory in the Morris water maze while sparing working memory. *Synapse*, 48(3), 138–148. <https://doi.org/10.1002/syn.10159>.

Willuhn, I. y Steiner, H. (2009). Skill-memory consolidation in the striatum: critical for late but not early long-term memory and stabilized by cocaine. *Behavioural Brain Research*, 199(1), 103-107. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.07.010>.

Yang, J., Ruchti, E., Petit, J. M., Jourdain, P., Grenningloh, G., Allaman, I. y Magistretti, P. J. (2014). Lactate promotes plasticity gene expression by potentiating NMDA signaling in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(33), 12228–12233. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322912111>.

Yin, H. H. y Knowlton, B. J. (2004). Contributions of striatal subregions to place and response learning. *Learning & Memory*, 11(4), 459–463. <https://doi.org/10.1101/lm.81004>.

- Yin, H. H. y Knowlton, B. J. (2006).** The role of the basal ganglia in habit formation. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(6), 464-476. <http://doi.org/10.1038/nrn1919>.
- Yin, H. H., Knowlton, B. J. y Balleine, B. W. (2005).** Blockade of NMDA receptors in the dorsomedial striatum prevents action-outcome learning in instrumental conditioning. *The European Journal of Neuroscience*, 22(2), 505–512. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04219.x>.
- Yin, H. H., Mulcare, S. P., Hilário, M. R., Clouse, E., Holloway, T., Davis, M. I., Hansson, A. C., Lovinger, D. M. y Costa, R. M. (2009).** Dynamic reorganization of striatal circuits during the acquisition and consolidation of a skill. *Nature Neuroscience*, 12(3), 333-341. <http://doi.org/10.1038/nn.2261>.
- Zhao, R., Jiang, S., Zhang, L. y Yu, Z. (2019).** Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 44, 3-15. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4188>.
- Zielke, H. R., Zielke, C. L. y Baab, P. J. (2009).** Direct measurement of oxidative metabolism in the living brain by microdialysis: a review. *Journal of Neurochemistry*, 109 Suppl 1(Suppl 1), 24-29. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05941.x>.