



Facultad de Ciencias

Participación de la proteína cinasa C
en el aprendizaje espacial

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A

ANA PAMELA SALCEDO TELLO

TUTORA: BIOL. ILSE DELINT RAMÍREZ

2007





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno. Apellido paterno: Apellido materno: Nombres (s) Teléfono Universidad:	Salcedo Tello Ana Pamela 55552661 Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad o escuela: Carrera: No. de cuenta:	Facultad de Ciencias Biología 402115883
2. Datos del tutor Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	Biól. Ilse Delint Ramírez
3. Datos del sinodal 1 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	Dr. Federico Bermúdez Rattoni
4. Datos del sinodal 2 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez
5. Datos del sinodal 3 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez
6. Datos del sinodal 4 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	Dra. María de Lourdes Segura Valdez
7. Datos del trabajo escrito. Título No. de páginas Año	Participación de la proteína cinasa C en el aprendizaje espacial 40 p. 2007

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y la Memoria del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Con el apoyo económico de CONACyT 42657 y DGAPA-UNAM IN-220706-3.

Un agradecimiento al Dr. Bermúdez por permitirme formar parte de su laboratorio.

A Ilse por su paciencia, sus consejos, su disposición para trabajar conmigo y no dejarme perder la motivación jamás.

Al resto de los miembros del jurado por sus valiosos comentarios acerca de este trabajo: Dra. Clorinda Arias Álvarez, Dra. Martha Escobar Rodríguez y Dra. María de Lourdes Segura Valdez.

A mis amigos Kioko Linko y Rodrigo Pastel, gracias por hacer felices cada uno de mis días en el laboratorio. A todos mis compañeros del laboratorio por compartir conmigo esta etapa tan importante en mi vida.

A las inigualables chicas ST: Julia mi amiba querida, Alejandra mi queridísima Marcelina, Rosa del Valle, Julia la gran Celia y Clau gracias por apoyarme siempre. A mis siempre amigos Sofía, Karla, María Luisa, Carlos, Johnathan, Andrés, Alberto y todos mis amigos de la Facultad de Ciencias gracias por compartir esto conmigo. ¡¡Los adoro, no es broma no!!

Rodrigo gracias por todo tu apoyo durante la realización de este trabajo. Tú ya sabes.

A mis tíos, primos y mis queridísimos sobrinos gracias por siempre confiar en mí.

Un agradecimiento especial a Alberto Camacho por su ayuda para realizar este trabajo

DEDICATORIAS

A mis padres Liliana y Humberto, porque son y serán siempre la razón de cada uno de mis logros. Con todo mi cariño esto es para ustedes.

A mi hermanita Fita, porque siempre has estado conmigo, no tengo palabras para agradecerte, gracias por confiar en mí siempre.

A mis queridas abuelitas Elvira y María de la Luz, gracias por todo su cariño.

A mi adorada prima Luscinda, sé que siempre estás conmigo. Te quiero.

A mis chicas y amigos por su apoyo incondicional.

INDICE

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
2.1 Aprendizaje y Memoria.....	2
2.2 Modelo de <i>Aplysia</i>	3
2.3 Hipocampo.....	6
2.4 Receptor NMDA.....	9
2.5 Proteína Cinasa C.....	12
2.6 Lipid Rafts.....	16
2.7 Aprendizaje Espacial.....	18
3. Hipótesis.....	21
4. Objetivos.....	21
5. Metodología.....	22
5.1 Entrenamiento en el laberinto acuático.....	22
5.2 Aislamiento de microdominios de membrana.....	22
5.3 Inmunoprecipitación.....	23
5.4 Western Blot.....	24
6. Resultados.....	25
6.1 Translocación a microdominios de membrana.....	25
6.2 Inmunoprecipitación.....	28
7. Discusión.....	31
8. Conclusiones.....	35
9. Tabla de abreviaturas.....	36
10. Bibliografía.....	37

RESUMEN

Los microdominios lipídicos (lipid rafts) son regiones membranales insolubles en detergentes no iónicos, ricos en esfingolípidos y colesterol. Estos microdominios son importantes para la transducción de señales debido a su alta concentración en moléculas involucradas en señalización, como la proteína cinasa C (PKC). La PKC es una cinasa de serina/treonina involucrada en muchos procesos de plasticidad como la formación de la memoria. El hipocampo juega un papel importante en procesar la información espacial en roedores. El receptor NMDA es un receptor de glutamato, que también participa en el proceso de formación de la memoria. Este receptor tiene varias maneras de ser regulado, por ejemplo, se ha reportado que puede ser fosforilado por diferentes cinasas, entre ellas PKC. Adicionalmente, recientemente se ha observado que el receptor compuesto por subunidades NR1/NR2A es reclutado a microdominios de membrana durante el aprendizaje espacial. Por lo tanto, para estudiar la participación de PKC en la formación de la memoria espacial en este trabajo se estudió el efecto del entrenamiento sobre la posible translocación de PKC a los rafts, adicionalmente se estudió su asociación con el receptor NMDA, y la fosforilación de éste. Los resultados mostraron que la PKC se transloca al lipid raft después del entrenamiento en el laberinto acuático. Sin embargo, también se observó que PKC está mas asociada a la subunidad NR2A en el grupo de animales controles de nado que en el grupo entrenado. En el caso de la subunidad NR2B no se ven cambios en la asociación entre el grupo control de nado y el grupo entrenado. Algunos autores reportan que la PKC γ fosforila directamente al receptor en la serina 890 de la subunidad NR1 lo cual disocia las agrupaciones de receptores que se encuentran en la membrana, por lo cual se podría pensar que esta isoforma de PKC se separa del receptor NMDA para permitir su movilidad hacia el microdominio de membrana.

Debido a que la fosforilación en tirosinas es uno de los mecanismos mediante los cuales PKC puede regular al receptor NMDA se analizó la fosforilación en tirosinas de la subunidad NR2A y la tirosina 1472 en la subunidad NR2B. Los resultados mostraron que la fosforilación en tirosinas de la subunidad NR2A y NR2B no cambia con el entrenamiento en el laberinto acuático en el grupo control ni en el grupo entrenado. Esto sugiere que PKC no está regulando al receptor mediante la fosforilación de estos residuos.

INTRODUCCIÓN

Aprendizaje y Memoria

La mayoría de los organismos presentan funciones cognitivas que llamamos aprendizaje y memoria. El aprendizaje es el proceso mediante el cual adquirimos conocimiento (Kandel, Hawkins 1992). La memoria, es el proceso mediante el cual lo que es aprendido persiste a través del tiempo (Squire, Kandel 2000).

En 1949 Donald Hebb propuso la noción de que las memorias de las experiencias sensoriales son almacenadas mediante modificaciones sinápticas en las regiones del cerebro que procesan esta información sensorial. En los últimos años se ha reunido una gran cantidad de evidencia que confirma que las memorias pueden ser guardadas gracias a pequeñas pero coherentes modificaciones que cambian ya sea en fuerza o número las sinapsis. Estas modificaciones ocurren por la actividad repetida tanto de la neurona presináptica como de la postsináptica, Esta idea también es un legado de Hebb y se le llama plasticidad sináptica (Kandel, Hawkins 1992).

Se cree que la memoria no es una entidad única, sino que existen diferentes tipos de memoria que involucran a diferentes sistemas neuronales en el cerebro. (Shu 2003)

Larry Squire en el año de 1987 basado en estudios en humanos y primates no humanos, propuso dividir la memoria con base en la naturaleza de la información. La dividió en declarativa y no declarativa. La memoria declarativa, también denominada explícita, se refiere a la capacidad de recolección de significados, hechos y eventos de manera “consciente” (Squire 1987, 1996). En la memoria declarativa se forman asociaciones entre dos estímulos diferentes. La memoria declarativa esta diseñada para representar objetos y eventos del mundo exterior y las relaciones entre ellos. La representación que se forma es flexible, es decir puede ser modificada (Kandel, Squire 2000).

La memoria no-declarativa, también llamada implícita, es “inconsciente” y se refiere a la colección heterogénea de habilidades motoras, hábitos, y sensaciones. Un ejemplo de este tipo de memoria es el condicionamiento clásico Pavloviano (Squire 1987, 1996).

La memoria también se puede dividir de acuerdo a su duración, en memoria a corto plazo y la memoria de largo plazo. La de corto plazo puede durar de minutos a horas y la de largo plazo puede durar por varios meses o incluso para siempre (Atkinson 1968).

La memoria a corto plazo no depende de síntesis de nuevas proteínas sino de modificaciones post-traduccionales en proteínas ya existentes. Por el contrario para que una memoria perdure a largo plazo necesita de síntesis de proteínas, lo cual se ha denominado consolidación (Squire, Kandel 2000).

El procesamiento de la memoria a largo plazo se ha dividido en 4 fases:

- Adquisición: Codificar el evento en un trazo de memoria en áreas específicas del cerebro
- Consolidación: Almacenar en una forma mas estable y en áreas específicas del cerebro
- Permanencia de la información almacenada por un periodo de tiempo
- Evocación: Recuperarla y utilizarla para guiar acciones

La plasticidad sináptica relacionada con el aprendizaje ha sido mayormente estudiada en *Aplysia* sp y en el hipocampo de mamíferos (Pittenger, Kandel 2003). El estudio de los mecanismos moleculares de la plasticidad en el hipocampo se ha complementado y comparado con estudios en modelos más simples como el de *Aplysia*.

Modelo de *Aplysia*

Kandel y Kupfermann descubrieron dos procesos de plasticidad sináptica en el reflejo de retracción de la branquia que presenta el caracol marino *Aplysia* (Kandel, Squire 2000). El sifón es utilizado para expulsar agua y desechos. Cuando se toca el sifón, éste y la branquia adyacente se retiran bajo un manto protector. La respuesta se llama reflejo de retracción de la branquia. La piel del sifón contiene 34 neuronas sensoriales que establecen sinapsis con 6 neuronas motoras, responsables de retraer el sifón y la branquia. Las neuronas sensoriales activan interneuronas que a su vez, establecen sinapsis con las neuronas motoras (Pinel 2001). En respuesta a un estímulo novedoso táctil en las neuronas sensoriales que innervan el sifón, se generan potenciales excitatorios sinápticos en interneuronas y motoneuronas. Los potenciales sinápticos de las neuronas sensoriales y de

las interneuronas se suman temporoespacialmente para así generar el reflejo de la retracción de la branquia en las motoneuronas (Kandel *et al.*, 2000)

La habituación, es la forma más simple de aprendizaje implícito. Cuando el sifón es estimulado, si el animal no detecta que el estímulo es benéfico o dañino, aprende después de varias exposiciones a ignorarlo. La habituación es resultado de la disminución de la eficiencia sináptica en las vías de las neuronas motoras que han sido activadas repetidamente. La habituación genera un decremento en la fuerza de las conexiones sinápticas entre interneuronas excitatorias y motoneuronas, lo cual se debe a una disminución en la liberación de neurotransmisor (Figura 1) (Kandel *et al.*, 2000).

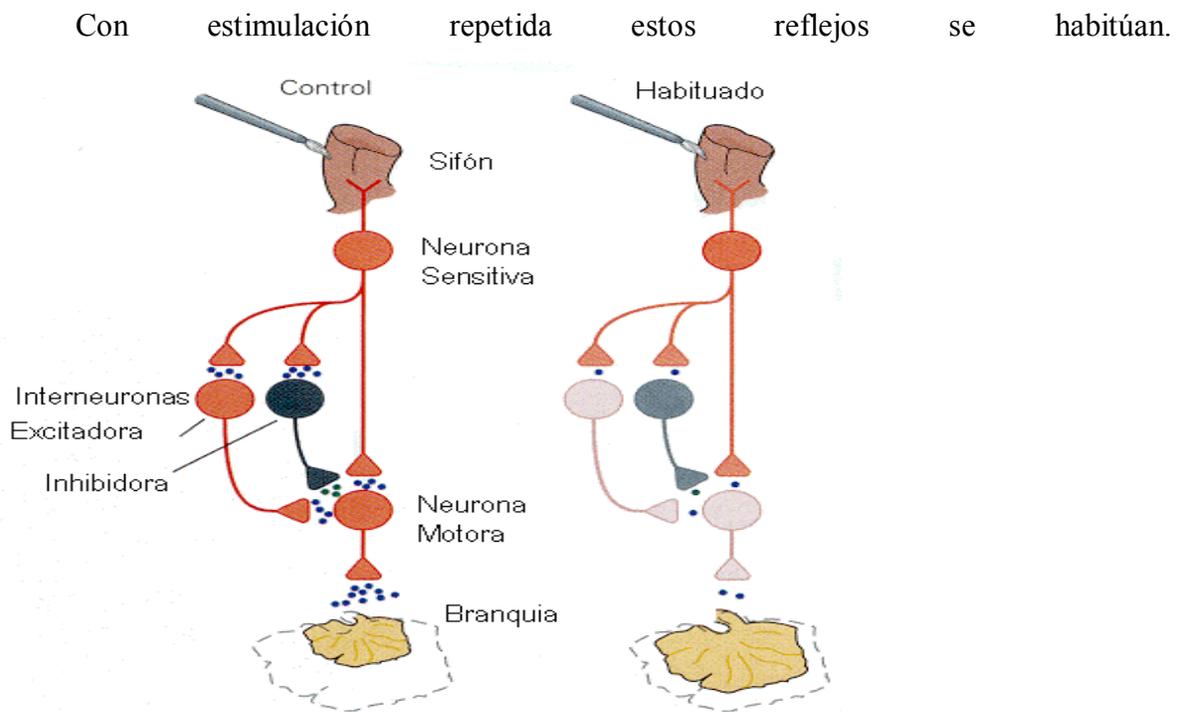


Figura 1. Modelo de habituación en *Aplysia*. (Modificado de Kandel *et al.*, 2000)

En el caso de estímulos dañinos, un animal aprende a responder más intensamente no solo a ese estímulo sino a otros incluso menos dañinos. Al incremento en las respuestas reflejas se le llama sensibilización. En el caso de *Aplysia* la sensibilización en la branquia se produce aplicando un estímulo en otra parte del cuerpo, por ejemplo en la cola. El estímulo en la cola activa neuronas sensoriales, éstas a su vez excitan a neuronas

facilitadoras las cuales forman sinapsis en las terminales de las neuronas sensoriales del sifón (Figura 2) (Kandel *et al.*, 2000).

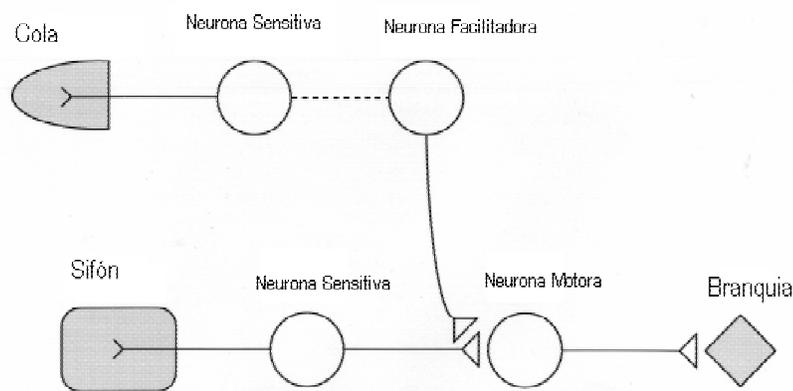


Figura 2. Modelo de sensibilización en *Aplysia*

En *Aplysia* se ha demostrado que sensibilización es el resultado de un aumento en la cantidad de neurotransmisor liberado por las neuronas sensoriales del sifón en respuesta a sus propios potenciales de acción. El mecanismo por el cuál se produce esto se denomina facilitación presináptica. Las fibras sensoriales que salen de la cola de *Aplysia* establecen sinapsis con interneuronas serotoninérgicas facilitadoras, que a su vez establecen sinapsis con los botones de las neuronas sensoriales del sifón. A través de estas neuronas serotoninérgicas, la estimulación intensa de la cola produce cambios en los botones de las neuronas sensoriales, de forma que cada potencial de acción que llega del sifón da lugar a una entrada mayor de iones de calcio y a una liberación mayor de neurotransmisor hacia las neuronas motoras (Pinel 2001). La liberación de serotonina a los botones de las neuronas sensoriales del sifón, producida por la descarga en la cola, da lugar a un aumento de los niveles de AMPc (AMP cíclico) en los botones. A su vez, el AMPc activa a la proteína cinasa A (PKA). La PKA hace que se cierren muchos de los canales de potasio en los botones, lo que produce un aumento de la duración de cada potencial de acción. Éste incremento en la duración de los potenciales de acción da lugar a un aumento de la entrada de calcio y por tanto, de la liberación de neurotransmisor en respuesta a cada contacto con el sifón.

Hipocampo

El sistema hipocampal se refiere a un grupo de estructuras en el lóbulo temporo-medial, esta constituido por la corteza entorrinal y la formación hipocampal. La formación hipocampal esta constituida por el Cuerno de Amón (CA), el giro dentado y el complejo subicular. El cuerno de amón y el giro dentado juntos forman una estructura en forma de caballito de mar que se arquea alrededor del mesencéfalo, esta estructura es el hipocampo. El Cuerno de Amón se divide en subregiones: CA1, CA2 y CA3 (Ramírez 1997).

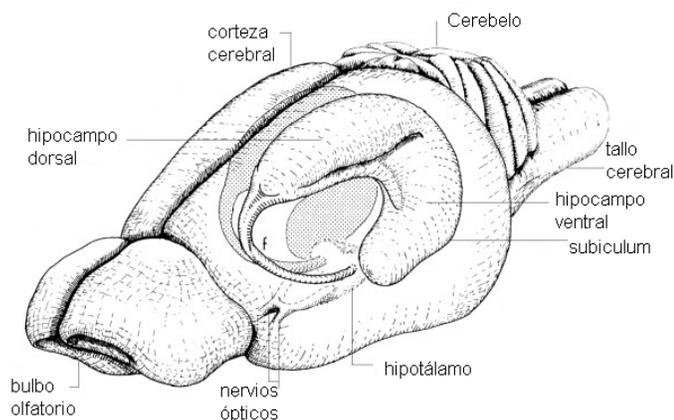


Figura 3. Modelo de cerebro de rata donde se representa el hipocampo. (Modificado de Cheung, Cardinal 2005)

El hipocampo es una estructura subcortical que se extiende caudalmente entre la neocorteza y el diencéfalo antes de curvarse ventralmente hacia el lóbulo temporal (Martin, Clark 2007). Esta estructura recibe información sensitiva polimodal a través de la corteza entorrinal, y recibe varios aferentes y eferentes de estructuras subcorticales y corticales (Martin, Clark 2007). La corteza entorrinal es la conexión principal entre el sistema hipocampal y las áreas corticales. La corteza entorrinal recibe sus principales inputs de la corteza perirrinal y la postrinal, y por lo tanto manda los principales inputs del giro dentado, CA1, CA2, CA3 y el subiculum. Además los eferentes de CA1 y el subiculum van hacia la corteza entorrinal y de ahí se dirigen principalmente a las cortezas perirrinal y postrinal (Ramírez 1997).

El hipocampo es un circuito trisináptico, debido a las conexiones entre sus campos. Los circuitos incluyen la vía perforante, que va de la corteza entorrinal al giro dentado; la vía de las fibras musgosas que va hacia CA3 y la vía colateral de Schaffer, que va hacia CA1. También se ha añadido la proyección de CA1 al subiculum. (Witter *et al.*, 2000).

Por otro lado los aferentes principales del hipocampo se originan de la corteza entorrinal, del septum, banda diagonal de Broca y el núcleo del tallo cerebral. La proyección de corteza entorrinal hacia hipocampo parece ser glutamatérgica. Mientras que aferentes colinérgicos y glutamatérgicos salen de la parte medial del septum y de la banda diagonal de Broca hacia el stratum oriens y stratum radiatum de CA1 y CA3 (Witter *et al.*, 2000). Tanto CA1 como CA3 reciben proyecciones serotoninérgicas del raphe y noradrenérgicas del locus coeruleus. Se cree que células gabaérgicas ejercen continuamente efectos inhibitorios sobre las células piramidales de CA1. El giro dentado también es innervado por proyecciones del septum y de la banda diagonal de Broca, estas vías son colinérgicas y glutamatérgicas. Otro recurso de innervación se origina en el núcleo del tallo cerebral (principalmente en el núcleo del raphe y el locus coeruleus) y de interneuronas GABAérgicas (Ramirez 1997).

El hipocampo es una estructura que se caracteriza por presentar rápida plasticidad sináptica; por lo cual es una de las estructuras cerebrales más estudiadas, ya que juega un papel importante en el aprendizaje y la memoria (Eichenbaum 2004; Ramos 2000).

En 1973 Bliss y Lomo encontraron que aplicando un periodo breve de actividad eléctrica en una vía hipocámpal (de las fibras de la vía perforante a giro dentado) generaba un incremento en la fuerza sináptica, esta podía durar horas en animales anestesiados y si se repetía podía durar hasta días o semanas en animales despiertos (Bliss, Lomo 1973). A esta facilitación se le denominó potenciación a largo plazo (LTP), por sus siglas en inglés, y se le considera un modelo celular artificial de plasticidad sináptica (Kandel, Squire 2000).

El LTP presenta tres fases que pueden ser inducidas de manera diferencial, la primera es la fase inicial, también se le llama potenciación a corto plazo, dura aproximadamente 30 minutos, no requiere la acción de cinasas ni de síntesis de proteínas. La segunda es la fase temprana, dura entre una y tres horas después de la estimulación eléctrica. Estas primeras 2 fases se inducen por un solo pulso de alta frecuencia y no requiere la síntesis de nuevas proteínas (Kandel 2001). Por otro lado si se aplican 3 o más pulsos de alta frecuencia se induce la fase tardía del LTP, la cual puede durar por al menos 28 horas y requiere

transcripción y traducción (Kandel, Squire 2000). La fase tardía del LTP al igual que la facilitación en *Aplysia* requiere de las cinasas PKA, MAPK y el factor de transcripción CREB (Kandel 2001).

Se conocen algunos mecanismos bioquímicos que llevan a la inducción de potenciación, se sabe que cuando se induce la fase temprana del LTP mediante un solo estímulo eléctrico de alta frecuencia, se libera glutamato de la terminal presináptica que activa a los receptores AMPA y NMDA con lo cual entra calcio a la célula postsináptica. El calcio se une a la calmodulina para activar cinasas de segundos mensajeros, que llevan a cabo funciones como la fosforilación del receptor AMPA, para incrementar la sensibilidad de estos receptores por el glutamato; y se cree que estas cinasas activan enzimas que generan señales retrogradadas que van hacia la terminal presináptica para incrementar la liberación de neurotransmisor. (Kandel, Squire 2000; Kandel 2001). Cuando se induce la fase tardía con pulsos eléctricos repetidos, el influjo de calcio es mayor y conlleva a la activación de la enzima adenilato ciclasa, esta enzima convierte el ATP en AMP cíclico. El AMPc se une a las subunidades reguladoras de la PKA, activándola y ésta se transloca posteriormente al núcleo. Una vez en el núcleo la PKA activa a CREB. CREB a su vez activa genes necesarios para los cambios estructurales (Kandel, Squire 2000; Kandel 2001), que son capaces de mantener la potenciación por periodos de tiempo más largos.

Tanto la plasticidad duradera como la memoria a largo plazo requieren la expresión regulada de genes y la síntesis de nuevas proteínas (Kandel, Squire 2000; Pittenger, Kandel 2003).

En *Aplysia*, la estimulación sináptica activa diversas cinasas, las cuales pueden migrar al núcleo de la neurona y actuar ahí. También las cinasas están implicadas en la señalización hacia el núcleo en la vía colateral de Schaffer en el hipocampo. Y las cinasas juegan un papel importante en la fase tardía del LTP (Kandel, Squire 2000; Pittenger, Kandel 2003). Tanto en *Aplysia* como en mamíferos el factor de transcripción CREB es necesario para la inducción de la expresión de genes (Pittenger, Kandel 2003).

El LTP tiene muchas características que lo proponen como un mecanismo de almacenamiento neuronal:

- ♣ Se da en las 3 vías hipocampales principales por las cuales fluye la información. Los efectos del LTP son más importantes en estructuras que intervienen en el aprendizaje y la memoria, como en hipocampo (Kandel, Squire 2000; Abraham, Williams 2003).
- ♣ Se induce rápidamente, una aplicación de estimulación eléctrica de alta frecuencia puede duplicar la fuerza de una conexión sináptica (Kandel, Squire 2000).
- ♣ Una vez inducida, es estable durante horas o incluso días (Kandel, Squire 2000).
- ♣ Tanto el mantenimiento de LTP y la retención de la memoria necesitan de la síntesis proteica; ambos dependen de la activación temprana de factores transcripcionales que involucran la fosforilación de CREB y la activación de factores de transcripción inducibles y ambos requieren de la expresión de genes similares que codifican para proteínas (Abraham, Williams 2003).
- ♣ Muchos experimentos han demostrado que si se bloquea varios de los componentes moleculares necesarios para el LTP también se observan daños en la memoria.

Receptor NMDA

Como ya se mencionó anteriormente la liberación de glutamato y particularmente la activación del receptor NMDA, juegan un papel importante en plasticidad sináptica (Cull-Candy 2001), aprendizaje y memoria (Gutiérrez *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2006).

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el cerebro de mamíferos (Kandel, Squire 2000). Existen dos tipos principales de receptores para glutamato: Iontrópicos (canales para sodio y calcio, su abertura es dependiente de ligando) o Metabotrópicos (acoplados a proteínas G) (Kandel, Squire 2000). Los receptores ionotrópicos son el AMPA, Kainato y el NMDA. Estos receptores están implicados en la rápida transmisión sináptica, sobrevivencia neuronal, plasticidad sináptica, también pueden

ocasionar la muerte neuronal por excitotoxicidad si son sobreactivados (Platenik *et al.*, 2000).

Los receptores AMPA/Kainato se abren y se desensibilizan rápidamente en respuesta a la unión a su agonista, estos canales permiten el influjo selectivo de iones sodio (Na^+), pero no de iones calcio (Ca^{2+}). Por otro lado el receptor NMDA sí permite la entrada de Ca^{2+} y Na^+ y su activación e inactivación son más lentas (Platenik *et al.*, 2000).

El receptor NMDA está altamente regulado ya que no solo necesita la unión del glutamato como agonista, también requiere la unión de la glicina (Platenik *et al.*, 2000). El zinc (Zn^{2+}) extracelular y las poliaminas también actúan sobre el receptor modificando su comportamiento (Cull-Candy 2001). El canal del receptor está bloqueado por cationes de magnesio, este bloqueo es dependiente de voltaje, por lo tanto para que el receptor se active requiere la despolarización de la membrana (Platenik *et al.*, 2000). Por lo cual se considera un detector molecular de coincidencia, pues para que el receptor NMDA abra su canal y genere LTP, es necesario que simultáneamente la membrana se despolarice para quitar el magnesio y que el glutamato se una al receptor (Bliss, Collingridge 1993).

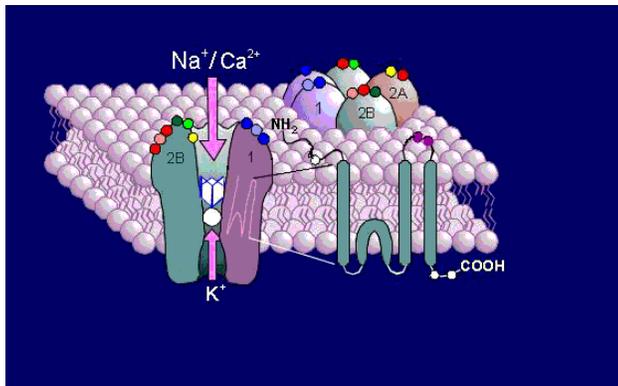


Figura 4. Receptor NMDA compuesto por subunidades NR2A y NR2B

Se han identificado diferentes subtipos de receptores NMDA en el sistema nervioso central, que difieren en la sensibilidad a los ligandos exógenos y endógenos, la permeabilidad y bloqueo de iones divalentes, las propiedades cinéticas y la interacción con proteínas intracelulares (Cull-Candy 2001).

Todos los receptores ionotrópicos de glutamato tienen una estructura heterooligomérica y están formados por diferentes subunidades. Para el receptor NMDA se han identificado 3 familias de subunidades: la subunidad NR1, la cual puede tener hasta 8 variantes debido al splicing alternativo, una familia de 4 subunidades diferentes NR2 denominadas A, B, C y D; 2 subunidades NR3 (A y B) (Cull-Candy 2001). Las subunidades NR2 y NR3 tienen variantes debido al splicing alternativo, aunque aún no se sabe la relevancia funcional de las variantes (Cull-Candy 2001). Los receptores NMDA están compuestos por subunidades NR1 en combinación con subunidades NR2. El dominio de la subunidad NR2 contiene el sitio de unión a glutamato, mientras que el dominio NR1 contiene el sitio de unión a la glicina (Platenik *et al.*, 2000).

Se cree que el receptor NMDA regula la remodelación dependiente de actividad durante el desarrollo (Kandel, O'Dell 1992). Estos mismos mecanismos parecen ser los responsables de la habilidad de las redes neuronales para hacer asociaciones estímulo-respuesta o estímulo-estímulo en el estado adulto (Dumas 2005).

Diversos estudios han revelado que la aplicación de antagonistas del receptor NMDA en el hipocampo afecta la adquisición del paradigma de aprendizaje espacial “water maze” y la inducción de LTP (McDonald *et al.*, 2004). También se ha comprobado que aplicando el antagonista del receptor NMDA, AP5 en el hipocampo se afecta la formación de la memoria espacial (Morris 1989). El receptor NMDA participa también en la formación de la memoria de reconocimiento de objetos (Abe *et al.*, 2004) y el condicionamiento aversivo al sabor (Gutiérrez *et al.*, 1999).

El receptor NMDA puede ser regulado de diferentes maneras, una de ellas es la interacción del receptor con proteínas cinasas y fosfatasas (Roche *et al.*, 1994). La fosforilación de residuos de serina/treonina y tirosina participan en la regulación del receptor NMDA (Salter, Kalia 2004). Por ejemplo, la inhibición de las cinasas de tirosinas en neuronas reduce la corriente de receptor y la aplicación de un inhibidor de fosfatasas de tirosina potencia las corrientes del receptor NMDA (Wang, Salter 1994). Una de las cinasas de serina/treonina capaz de interactuar con el receptor NMDA es la PKC (Grosshans, Browning 2001; Xiong *et al.*, 1998; Groc *et al.*, 2004).

Proteína Cinasa C

El término proteína cinasa C define a una familia de cinasa de serina/treonina, que están implicadas en múltiples funciones celulares. Éstas cinasas participan en procesos de transducción de señales a corto plazo (flujo de iones, liberación de neurotransmisores), a mediano plazo (modulación de receptores), y a largo plazo (proliferación celular, remodelación sináptica, y expresión de genes) (Amadio, *et al.*, 2006).

La vía clásica de activación de la proteína cinasa C se da mediante un receptor acoplado a proteínas G triméricas. Las proteínas G triméricas están compuestas como su nombre lo dice por 3 subunidades: α , β y γ . En su estado inactivo la subunidad α une guanosin difosfato (GDP), cuando es estimulada por la activación del receptor la subunidad α libera el GDP y une GTP (guanosin trifosfato). Esta unión ocasiona que la proteína G se separe en 2 componentes: α y $\beta\gamma$. Estos receptores activan la enzima fosfolipasa C- β (PLC β). La PLC actúa sobre el fosfoinosítido localizado en la parte interior de la membrana, fosfatidilinositol 4,5-bifosfato [PI (4,5) P₂]. La PLC corta al [PI (4,5) P₂] y genera 2 productos: inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃), y diacilglicerol (DAG). Por un lado el IP₃ se va de la membrana hacia el citosol y al llegar al retículo endoplásmico, se une a canales y genera la liberación del calcio almacenado en éste. El DAG, que permanece en la membrana puede actuar de diferentes maneras, una de ellas es activando a la PKC. En las isoformas dependientes de calcio, el incremento inicial generado por la acción del IP₃ provoca el movimiento de PKC del citosol a la membrana y ahí se une al DAG y al fosfolípido de carga negativa, fosfatidilserina (Figura 5) (Alberts *et al.*, 2002).

A)

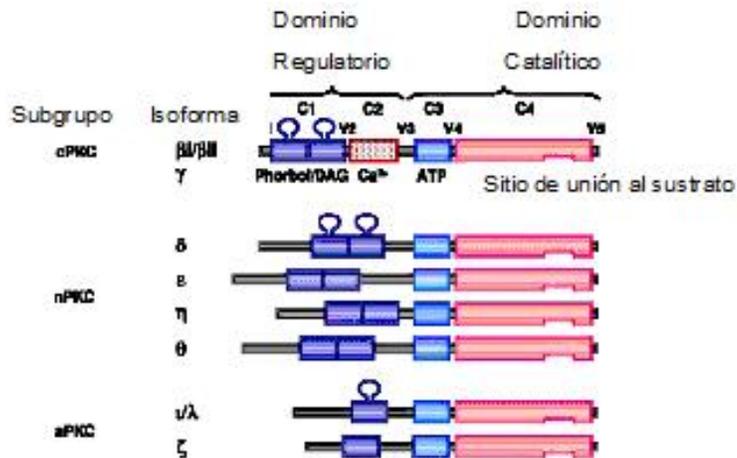
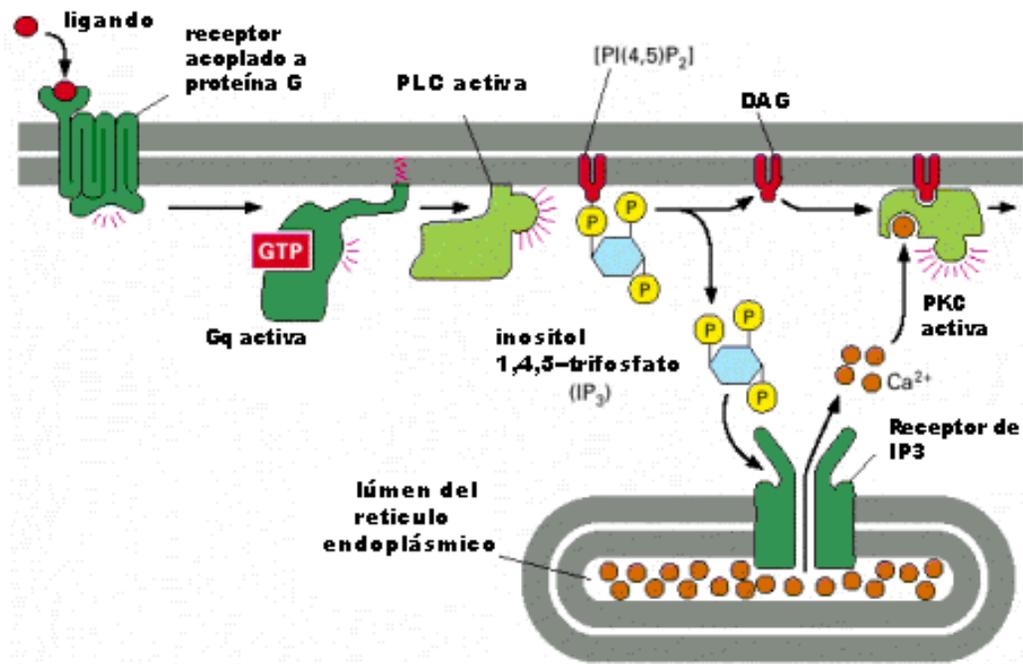


Figura 5. A) Vía de activación de PKC mediante la proteína Gq acoplada a receptor. Modificado de Alberts *et al.*, 2002 B) Estructura de las isoformas de PKC. (Modificada de Salamanca, Khalil 2005)

Existen 3 diferentes clases de PKC's:

- (1) dependientes de calcio o PKC clasica cPKC (α , β I, β II, γ)
- (2) independientes de calcio o nuevas nPKC (η , ϵ , θ y δ)
- (3) independientes de calcio y de DAG, atípicas aPKC (ζ y λ/ι)

La proteína cinasa C está implicada en los procesos de aprendizaje y memoria a través de la evolución (Nogues 1997). En invertebrados, se ha demostrado que participa en modelos de plasticidad, como el de retracción de la branquia en *Aplysia* (Kandel, Squire 2000). Se ha demostrado que PKC se transloca del citosol a la membrana después de la sensibilización del la retracción de branquia (Sacktor, Schwartz 1990).

Experimentos con animales genéticamente modificados, sugieren que algunas isoformas de PKC son importantes para la formación de la memoria espacial, y estudios anteriores indican que varios sustratos se activan después de un aprendizaje espacial (Bonini *et al.*, 2007). Se ha reportado que la actividad de PKC es reducida en el hipocampo en ratones que no tienen un buen desempeño en tareas espaciales (Wehner *et al.*, 1990). Se ha observado que la inyección de PMB (polymyxin B, inhibidor de PKC) afecta el desempeño de ratas también en tareas espaciales (Nogues *et al.*, 1996), mientras que la inyección intracerebroventricular del activador de PKC, PdBu (phorbol 12, 13-dibutyrate) mejora este tipo de memoria en ratas (Paylor *et al.*, 1991).

PKC está implicada en LTP dependiente del receptor NMDA y posiblemente contribuye a incrementar la eficiencia sináptica. (Carroll *et al.*, 1998). La inyección de PKC en células de la postsinápsis incrementa la transmisión sináptica (Hu *et al.*, 1987), mientras que al aplicar un bloqueador de la actividad de la cinasa bloquea la inducción de LTP (Malinow 1989). También se demostró que ratones con delección del gen de PKC γ presentan una disminución en el LTP.

Como se mencionó anteriormente, la fosforilación de las subunidades del receptor NMDA es uno de los mecanismos que lo regulan. La subunidad NR1 cuenta con 2 sitios de fosforilación para la PKC, Ser 890 y Ser 896 (Tingley *et al.*, 1997; Besshoh *et al.*, 2005).

La aplicación de un fragmento de la PKC constitutivamente activo a cultivos de células hipocámpales genera un incremento en las corrientes evocadas del receptor NMDA (Xiong *et al.*, 1998). La activación de la PKC induce la fosforilación en tirosinas de las subunidades NR2A y NR2B del receptor NMDA a través de la activación de cinasas de tirosina de la familia de SRC (Grosshans *et al.*, 2001; MacDonald 2001)), lo cual incrementa la conductancia del canal. La activación de PKC genera un incremento en las corrientes evocadas del receptor NMDA, la aplicación de un inhibidor de cinasas de tirosina y específicamente de cinasas SRC bloquea este efecto (Lu *et al.*, 1999). La activación de PKC incrementa las corrientes evocadas del receptor NMDA y la probabilidad de apertura del canal del receptor, y potencia las corrientes en ovocitos de *Xenopus* transfectados con subunidades recombinantes del receptor (Chen 1992; Xiong 1998).

Una forma adicional en que PKC interviene en la funcionalidad del receptor NMDA es regulando su movilidad. Se ha reportado que al aplicar TPA (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate, activador de PKC) incrementa la movilidad del receptor NMDA (Groc *et al.*, 2004). También se ha demostrado que aplicando TPA a neuronas hipocámpales incrementa la cantidad de receptores NMDA en la membrana plasmática, mientras que en otras condiciones PKC induce la exocitosis del receptor (Lan *et al.*, 2001).

Tanto la proteína cinasa C como el receptor NMDA pueden ser regulados mediante su translocación a microdominios de membrana (lipid rafts) (Bi *et al.*, 2001; Orito *et al.*, 2001; Besshoh *et al.*, 2004; Abulrob *et al.*, 2005)

Lipid Rafts

Las membranas biológicas se organizan en arreglos de lípidos y proteínas con pequeñas cantidades de carbohidratos. Estas membranas regulan la composición del medio intracelular, controlando el flujo de nutrientes, desechos, iones, etc, que entran y salen de la célula (Voet-Voet 2004).

La membrana celular no es homogénea en estructura ni composición de lípidos. Los lipid rafts son pequeños microdominios (10-200 nm) en la membrana plasmática con un alto contenido de colesterol y esfingolípidos, estos sitios son de gran importancia para muchas funciones celulares (Suzuki 2002). Son insolubles en detergentes no-iónicos y se encuentran asociadas con receptores de manera constitutiva o al activarse se desplazan hasta estos dominios (Suzuki 2002). Estos microdominios son ricos en colesterol y en proteínas ancladas por glucofosfatidilinositol (Jacobson *et al.*, 2007).

Los esfingolípidos difieren de la mayoría de los fosfolípidos biológicos en que contienen largas cadenas acilo altamente saturadas. Esto les permite empacarse firmemente unidos y formar los lipid rafts. Además les confiere un punto de fusión mayor al de los fosfolípidos comunes, los cuales cuentan con cadenas acilo insaturadas (Brown 2000).

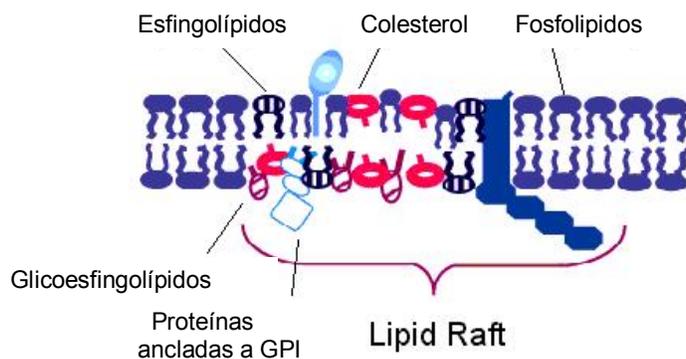


Figura 6. Componentes de los microdominios de membrana

Los lipid rafts son estructuras altamente dinámicas y no presentan una morfología definida (Suzuki 2002). El principio fundamental de los rafts es la separación o concentración de proteínas de membrana específicas y lípidos en microdominios de la membrana celular (Harder *et al.*, 1998). Así que la translocación de proteínas hacia los microdominios de membrana debe afectar la función de estas ya que el agrupar a las proteínas en los rafts podría facilitar las interacciones entre ellas y probablemente también alterar su función (Brown 2000).

Recientemente varias proteínas que se localizan en la sinapsis han sido reportadas en estos microdominios incluyendo receptores NMDA, AMPA, GABA, acetilcolina, Trk, moléculas como PSD-95, ErbB4, annexina II, CASK y proteínas G monoméricas y triméricas, además de las cinasas de la familia SRC (Becher *et al.*, 2001; Besshoh *et al.*, 2005; Guirland *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2003; Mukherjee *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2004). También se ha visto que estos microdominios son abundantes en dendritas y que son indispensables para el mantenimiento de la sinapsis y espinas dendríticas así como para la estabilidad de receptores en la membrana sináptica (Hering *et al.*, 2003; Takebayashi *et al.*, 2004). Se reporta también que en la densidad postsináptica hay regiones que se encuentran asociadas a los microdominios y regiones asociadas a la membrana soluble (Abulrob *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2003). Estudios recientes muestran evidencias de que estos microdominios son importantes para la señalización por factores de crecimiento, moléculas de adhesión celular, guiado axonal y tráfico vesicular (Guirland *et al.*, 2004; Tooze *et al.*, 2001; Yanagisawa *et al.*, 2004).

Se sabe también que PKC participa en la transducción de señales en los lipid rafts. Bi y colaboradores demostraron que al activar células T en cultivo la PKC- θ migra hacia los lipid rafts (Bi *et al.*, 2001). En sistema nervioso central también se ha visto la asociación de PKC α a los microdominios de membrana en presencia de calcio (Orito *et al.*, 2001). En cultivos de células granulares de cerebelo, la PKC migra a las fracciones resistentes a detergentes (rafts) después de la aplicación de TPA (activador de PKC) y también después de añadir glutamato (Botto *et al.*, 2007).

El receptor NMDA se puede mover lateralmente hacia adentro y hacia afuera del lipid raft (Besshoh *et al.*, 2005), lo cual potencia la señalización mediada por la activación del receptor. Se ha visto que la hiperfosforilación del receptor NMDA que genera la isquemia y

que contribuye la muerte neuronal, es mayor dentro de estos microdominios que fuera de ellos.

También se demostró que al inducir isquemia en ratas, el receptor NMDA se disocia del raft y se transloca hacia la región de la densidad postsináptica no asociada a rafts, posiblemente como un mecanismo para proteger a la célula (Besshoh *et al.*, 2005). Abulrob y colaboradores demostraron que en cultivo de células corticales la extracción del colesterol de la membrana mediante ciclodextrinas protege a las células de la muerte por excitotoxicidad mientras que al agregar colesterol se recupera la muerte neuronal. Sin embargo las ciclodextrinas no afectan la cantidad de calcio que entra por el canal del receptor NMDA (Abulrob *et al.*, 2005). Esto indica que la función del receptor cambia dependiendo de dónde está ubicado, pero no es debido a la conductancia de calcio. La ubicación del receptor es muy importante ya que impide que la célula muera.

En nuestro laboratorio se ha observado que en el hipocampo el entrenamiento en la tarea espacial del laberinto de agua induce la translocación de las subunidades NR1 y NR2A del receptor NMDA y no de la subunidad NR2B hacia los microdominios de membrana.

Aprendizaje Espacial: Laberinto de Agua

Uno de los paradigmas de aprendizaje y memoria espacial mas usado es el laberinto acuático de Morris o water maze. El aprendizaje espacial se clasifica como del tipo de la memoria declarativa.

El water maze o laberinto de agua consiste en una alberca de forma circular, aproximadamente entre 1- 2 metros de diámetro, cuyas paredes y fondo son de color negro (Gutierrez *et al.*, 1999). Dentro de uno de los cuadrantes del laberinto acuático se encuentra sumergida una plataforma de forma circular o redonda de aproximadamente 10x10 cm. La plataforma se ubica en el centro de uno de los cuatro cuadrantes en que está dividido el laberinto de agua. La superficie expuesta debe ser totalmente homogénea para que el animal solo use claves fuera del laberinto para ubicarse espacialmente y encontrar la plataforma (McDonald *et al.*, 2004).

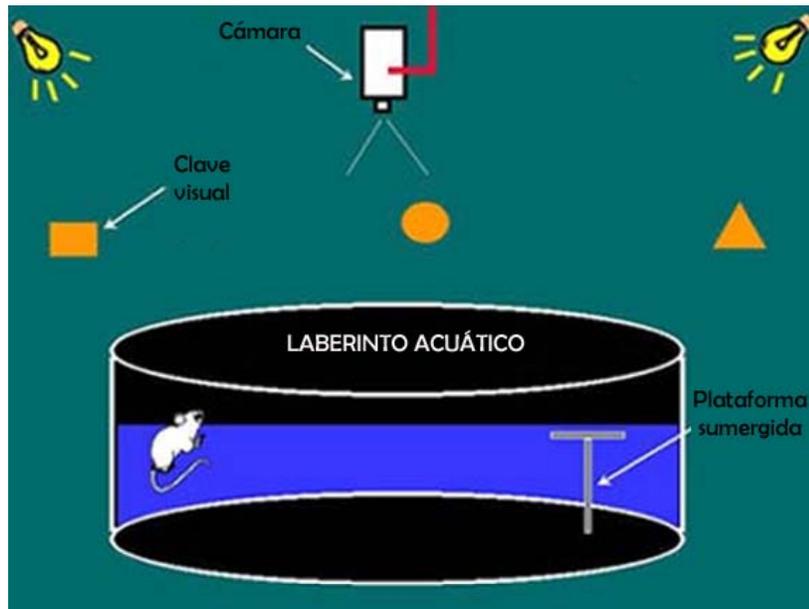


Figura 7. Laberinto acuático de Morris

Esta tarea se utiliza para que el animal aprenda la ubicación de la plataforma que esta escondida bajo el agua en uno de los cuadrantes del water maze. La plataforma se encuentra aproximadamente 1 cm. por debajo de la superficie (McDonald *et al.*, 2004).

El entrenamiento consiste en 10 ensayos, en cada uno se coloca a la rata en un lugar diferente del laberinto. En cada ensayo se le da un minuto para que encuentre la plataforma, pasado un minuto si no encuentra el animal la plataforma se le lleva hacia ella. Se deja a la rata durante 30 segundos en la plataforma para que pueda ubicarse, después se le coloca en una caja de acrílico otros 30 segundos para que descanse entre cada ensayo. El objetivo de esta tarea es que el animal aprenda y recuerde dónde esta la plataforma (Nerad *et al.*, 1996).

Utilizar esta tarea representa muchas ventajas, entre ellas que el laberinto es homogéneo, no presenta claves locales. Esto asegura que el sujeto no pueda usar claves intralaberinto (McDonald *et al.*, 2004).

Un animal puede encontrar la plataforma utilizando 3 estrategias diferentes (D'Hooge, De Deyn 2001). Puede usar una secuencia de movimientos aprendidos que lo llevarán a la plataforma; aproximarse a la plataforma guiándose por claves proximales o

puede llegar usando información de la ubicación de la plataforma en el espacio mediante claves distales (D'Hooge, De Deyn 2001).

Muchos estudios han examinado el papel de diferentes estructuras cerebrales en el aprendizaje del water maze. Hasta ahora es claro que la formación hipocampal es necesaria para el aprendizaje espacial. La memoria espacial es un tipo de memoria declarativa en la cual se sabe que el hipocampo participa de manera muy importante (Eichenbaum 2004; Martin, Clark 2007; Ramos 2000). El daño al hipocampo causa severas deficiencias en el desempeño de los roedores en tareas espaciales, como el laberinto radial (Ramos, 2000), laberinto de agua (Morris 1982) y laberinto T (McHugh *et al.*, 2007).

Como se mencionó anteriormente, se sabe que tanto PKC como el receptor NMDA participan de manera importante en la formación de la memoria espacial. Sin embargo no se ha estudiado de qué manera interviene esta cinasa durante el proceso de plasticidad que es requerido para la formación de este tipo de memoria. Debido a que PKC es un factor muy importante en la regulación del receptor NMDA probablemente su participación está relacionada con la regulación de este receptor en el proceso de la formación de la memoria espacial.

Debido a que en el laboratorio ya se demostró que después de 10 ensayos en el laberinto de agua el receptor NMDA se introduce al lipid raft en el hipocampo y en la corteza insular, quisimos saber si la proteína cinasa C estaba implicada en la movilización del receptor y si esta cinasa también se translocaba al raft como consecuencia del aprendizaje espacial. Y de ser así de qué manera interactúa con el receptor NMDA.

HIPÓTESIS

- i. Ya que el receptor NMDA es reclutado hacia los rafts durante la adquisición de la tarea del water maze y PKC modula a este receptor, es posible que dicha cinasa también se transloque a estos microdominios.
- ii. Si PKC modula al receptor NMDA en la adquisición de la tarea espacial, la asociación de PKC con el receptor debe cambiar durante el entrenamiento.

OBJETIVO

- 1) Investigar la participación de la proteína cinasa C en el aprendizaje espacial en el hipocampo.
- 2) Determinar si en el hipocampo la PKC, al igual que el receptor NMDA, se transloca a microdominios de membrana después del entrenamiento en el laberinto acuático.
- 3) Analizar si la asociación de receptor NMDA y PKC cambia después de la adquisición de la tarea.
- 4) Determinar si existe cambio en la fosforilación de las subunidades del receptor NMDA (NR2B pY1472, NR2A pY total) después del entrenamiento.

METODOLOGÍA

Entrenamiento

El entrenamiento se realizó en un laberinto acuático que consiste de un tanque circular de 1.5m de diámetro y 1.0m de altura, con fondo y paredes negras, con una plataforma oscura localizada en una posición fija y sumergida 1 cm. El tanque está localizado en un cuarto iluminado con poca luz y rodeado por varias claves espaciales. El entrenamiento consta de 10 ensayos. En cada ensayo el animal es introducido en el tanque en una de 10 posiciones preestablecidas azarosamente, se le permite nadar por un máximo de 60s hasta que localice la plataforma, donde permanece por 30s. Si el animal no encuentra la plataforma en el límite de tiempo se le conduce hacia ella con la mano. Después de los 30s en la plataforma, el animal descansa por 30s en una caja fuera del laberinto, antes del siguiente ensayo. Se mide en cada ensayo el tiempo en que la rata llega a la plataforma (latencia) mediante un sistema computarizado (Chromotrack 3, San Diego Instruments). Además de las ratas entrenadas se utiliza un grupo de ratas controles de nado, estas ratas fueron introducidas en 10 ocasiones al laberinto acuático sin la plataforma, en donde nadaron en cada ensayo el mismo tiempo promedio que las ratas entrenadas.

Aislamiento de microdominios de membrana

Muestras de tejido del hipocampo dorsal de ratas entrenadas y controles de nado sacrificadas inmediatamente después del entrenamiento fueron lisadas con un sonicador (Branson Sonifier) en buffer de lisis (Triton 1%, NaCl 150mM, 25mM Tris-HCl pH 7.5, tableta de inhibidores de proteasas (Complete, Roche), 50mM NaF, 10mM NaP₂O₇, 1mM Ortovanadato de Na). Las muestras se centrifugaron a 1000 x g durante 10 minutos a 4°C. Se desecha el pelet (núcleos y restos celulares). Se cuantificaron las proteínas de las muestras mediante el método de Lowry (Bio-Rad Dc Protein Assay; Catalog: 500-0113, 0114,0115). Las muestras con la misma cantidad de proteínas fueron centrifugadas a 15 000 x g a 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante se desechó y el pelet se resuspende en 0.5 mL del mismo buffer de lisis. Se mezcló con 1 mL de sacarosa 2M en buffer con NaCl 150mM, 25mM Tris-HCl pH 7.5, tableta de inhibidores de proteasas. Se añadió 2 mL de sacarosa 1M y posteriormente 1.5 mL de sacarosa 0.2 M. Una vez hecho el gradiente se centrifuga durante 18 horas, 200 000 x g. Después de la centrifugación se extraen 5 fracciones de 1 mL y el pelet es resuspendido

en 0.5 mL de buffer de lisis. La interfase entre 0.2M y 1.M (fracción 2) es donde se encuentran los microdominios de membrana. Igual volumen de cada fracción se cargaron en un Western Blot.

Inmunoprecipitación

Las muestras fueron homogenizadas en buffer de lisis (Tris-HCl 50mM, NaCl 150mM, Nonidet P40 1% o Triton 1%, Ortovanadato de Sodio 10mM, Fluoruro de Sodio 25mM, inhibidores de proteasas Roche, pH 7.5). Todos los procedimientos se realizaron a 4°C. Se centrifugó a 1500 x g por 5 minutos para retirar núcleos y restos celulares grandes. Se midió la concentración de proteínas mediante ensayo de Lowry. (Bio-Rad Dc Protein Assay; Catalog: 500-0113,0114,0115). Las subunidades NR2A o NR2B se inmunoprecipitaron a partir de 2 a 3 mg de proteína con 12µl de anticuerpo monoclonal específico para NR2A o NR2B (1:500 Santa Cruz Biotech. Inc. sc-1468 y sc-1469 respectivamente) en 0.5ml de buffer de lisis, se incubó toda la noche posteriormente se agregó 30µl de proteína G-agarosa (Roche) ,y se incubó a 4°C en agitación constante durante 2 horas, después se centrifugó por 2 minutos a 1500 x g. El pelet se lavó 2 veces con 300 µl de buffer de lisis, 2 veces más con buffer de alta concentración de sales (Tris-HCl 50mM, NaCl 150mM, Nonidet P40 0.1% o Tritón 0.1%, pH 7.5) y para retirar las sales se realizó un lavado con Tris-HCl 50mM pH 7.5, Nonidet P40 0.1% o Tritón 0.1%. Las centrifugaciones entre cada lavado se realizaron a 1500 x g. Después de estos lavados se centrifugó a 5000 x g durante 3 minutos, se retiró el sobrenadante y el pelet fue resuspendido en 20µl de buffer Laemmli con 10% de β-mercapto-etanol. Se hirvieron las muestras durante 5 minutos y se centrifugan a temperatura ambiente a 2000 x g durante 3 minutos. Las muestras fueron probadas en un Western Blot.

Western Blot

Veinte μg de proteína de lisado de hipocampo al igual que las muestras de los gradientes y de la inmunoprecipitación fueron mezcladas con buffer Leammli 1:1 y hervidas durante 5 minutos. Posteriormente fueron cargadas en un gel 7.5% SDS-poliacrilamida (SDS page). La electroforesis se llevó a cabo a 110V durante una hora y media. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (BioRad) a 25 V por 50 minutos. El buffer de transferencia está compuesto de 25mM Tris, 192 mM glicina, 0.1% SDS y 20% (vol/vol) de metanol. La membrana resultante de la transferencia se incubó toda la noche en buffer TBS-T (Tris 10mM, NaCl 0.9%, Tween 20 0.1% pH 7.5) con 5% de BSA. Para detectar PKC, las membranas de PVDF fueron incubadas por 24 horas a 4°C con anticuerpo monoclonal Anti-Proteína Kinasa C hecho en ratón (1:60000; SIGMA P5702-.2ML) o policlonal Anti-Proteína Kinasa C hecho en conejo (1:300; Santa Cruz Biotech. Inc. sc10800).

Para detectar las subunidades del receptor NMDA, las membranas de PVDF fueron incubadas 24 horas a 4°C con: anticuerpo anti NR2A y anti NR2B policlonales hechos en cabra (1:500; Santa Cruz Biotech. Inc. sc1467 y sc1469 respectivamente); Anti NR2B fosfotirosina 1472 hecho en conejo (1:1000; Sigma M2442); Anti fosfotirosinas monoclonal hecho en ratón (1:500; Sigma P-3300).

Las membranas se lavaron durante 5 minutos 4 veces en TBS-T, y se incubaron por una hora con anticuerpo conjugado a peroxidasa de rábano (Anti ratón hecho en cabra IgG Zimed 626620; Anti cabra hecho en burro IgG Sigma A3415; Anti conejo hecho en ratón IgG Sigma A2074). Las membranas se lavaron 4 veces por 5 minutos con TBS-T y 2 veces con TBS. Después la membrana se incubó con sustrato quimioluminiscente HRP (ImmobilonTMWester, Millipore) y se expuso en placas radiográficas. La inmunoreactividad se cuantificó densitométricamente con el software ImageJ 1.31V, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA. Los controles negativos se hicieron sin agregar los anticuerpos primarios.

A las membranas que se les quitó el anticuerpo para posteriormente incubarla contra otro anticuerpo, se lavaron 2 veces durante 20 minutos a 37°C en buffer de elución Tris 62.5 mM, 2% SDS, β -mercaptoetanol 100 mM), se lavaron 5 veces con TBS-T, se bloquean con BSA 5% durante media hora y se incubó con el anticuerpo correspondiente.

RESULTADOS

Translocación de PKC a microdominios de membrana

Para analizar si el entrenamiento en el laberinto acuático induce el reclutamiento de PKC a los microdominios lipídicos de membrana, se utilizaron 2 grupos de ratas, el grupo control y el entrenado. Las ratas pertenecientes al grupo entrenado fueron sometidas a 10 ensayos en el laberinto acuático de Morris. Las ratas del grupo control nadaron 10 ensayos aproximadamente el mismo tiempo que en promedio nadan las ratas entrenadas en el mismo tanque pero sin plataforma ni claves espaciales. Inmediatamente después de concluido el entrenamiento o el nado en el laberinto acuático, las ratas de ambos grupos fueron sacrificadas y se aisló una muestra de hipocampo dorsal. Para aislar los microdominios se utilizó un gradiente de sacarosa. Se obtuvieron 5 fracciones de 1 mL y el pellet. Volúmenes iguales de cada fracción fueron analizadas mediante un Western Blot. Como se muestra en la figura 8, la fracción 2 se encuentra altamente enriquecida en flotilina-1, la cual es una proteína que se localiza casi exclusivamente en estos microdominios, por lo cual la fracción 2 corresponde a los microdominios y la fracción 5 a la parte más densa insoluble en tritón X-100.

Los resultados mostraron que efectivamente la PKC se transloca a los lipid rafts después del entrenamiento en el laberinto acuático (Figura 9), pues hay un incremento significativo entre el grupo entrenado y el control de nado.

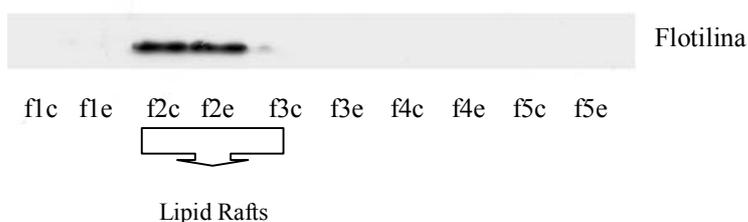


Figura 8. Los microdominios (lipid rafts) se localizan en la fracción 2 del gradiente. Inmunoblot para detectar Flotilina-1 (marcador de lipid rafts) en todas las fracciones del gradiente de sacarosa.

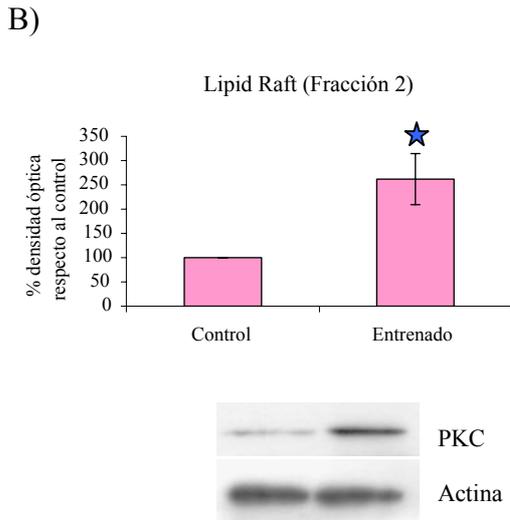
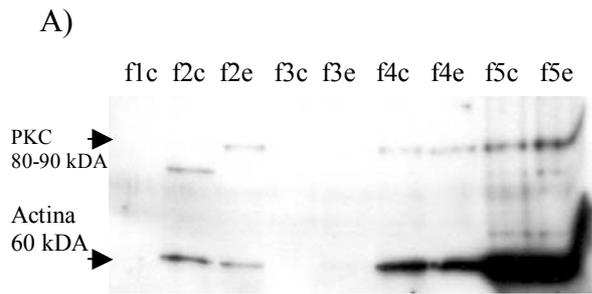
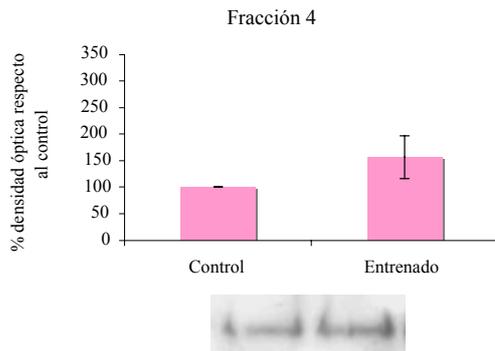


Figura 9. PKC se transloca al lipid rafts después del aprendizaje espacial. A) Inmunoblot representativo mediante los cuales se analizaron las fracciones del gradiente, se muestran las marcas correspondientes a PKC y actina f = fracción c = control e = entrenado. B) Análisis densitométrico de las bandas correspondientes a PKC en las fracciones 2 y blot representativo de PKC y Actina. Todos los resultados son expresados como promedio \pm error estándar ($n = 4$, $*p = 0.021$).

Por otro lado en la fracción 4 no hubo diferencia significativa en la cantidad de PKC entre animales controles y entrenados (Figura 10). Mientras que la fracción 5 también mostró un incremento en el grupo entrenado con respecto al control. Sin embargo, este incremento es menor comparado al que ocurre en la fracción 2 (Figura 10B).

A)



B)

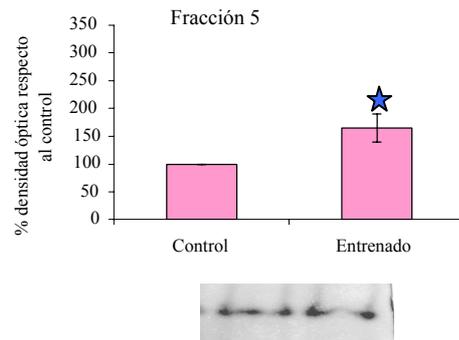


Figura 10. Incremento de PKC en la fracción 5. Análisis densitométrico de la marca correspondiente a PKC en la fracción 4 (A) y en la fracción 5 (B) e inmunoblot representativo de las fracciones respectivas del gradiente de sacarosa. Solo se observan incremento significativo en la fracción 5 en el grupo entrenado con respecto al control. Todos los resultados son expresados como promedio \pm error estándar (n = 4, *p = 0.04).

Como control de carga, para demostrar que no hay cambios en la cantidad de proteína, las membranas fueron incubadas también contra actina, sin embargo esto no pudo ser realizado en todos los experimentos (Figura 11A).

También se analizó la cantidad total de PKC en muestras de lisado de hipocampo de ambos grupos y se comprobó que no hay cambios (Figura 11).

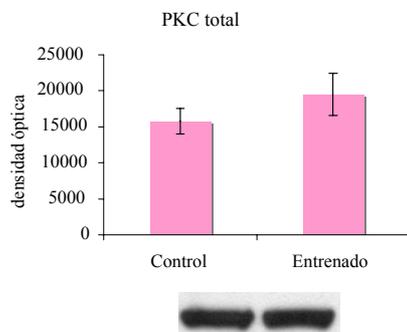


Figura 11. La cantidad total de PKC no cambia. Análisis densitométrico e inmunoblot representativo mediante los cuales se analizó la cantidad total de PKC. Todos los resultados son expresados como promedio \pm error estándar (grupos control n=9 y entrenado n=10).

Inmunoprecipitación del receptor NMDA con PKC

Para determinar si el aprendizaje espacial cambia la asociación de PKC con el receptor NMDA, se inmunoprecipitaron las subunidades NR2A y NR2B en muestras de hipocampo dorsal y mediante Western Blot se analizó la cantidad de PKC que se coprecipita con dichas subunidades en ratas control y entrenadas. Debido a que PKC regula la fosforilación en tirosinas del receptor NMDA, se estudió el cambio en la fosforilación en las tirosinas de la subunidad NR2A, y la fosforilación en la tirosina 1472 de la subunidad NR2B.

La inmunoprecipitación de NR2A mostró que la PKC se encuentra más asociada a dicha subunidad en el grupo control (Figura 12A). En la fosforilación en tirosinas no se observaron cambios entre el grupo control y el grupo entrenado (Figura 12B).

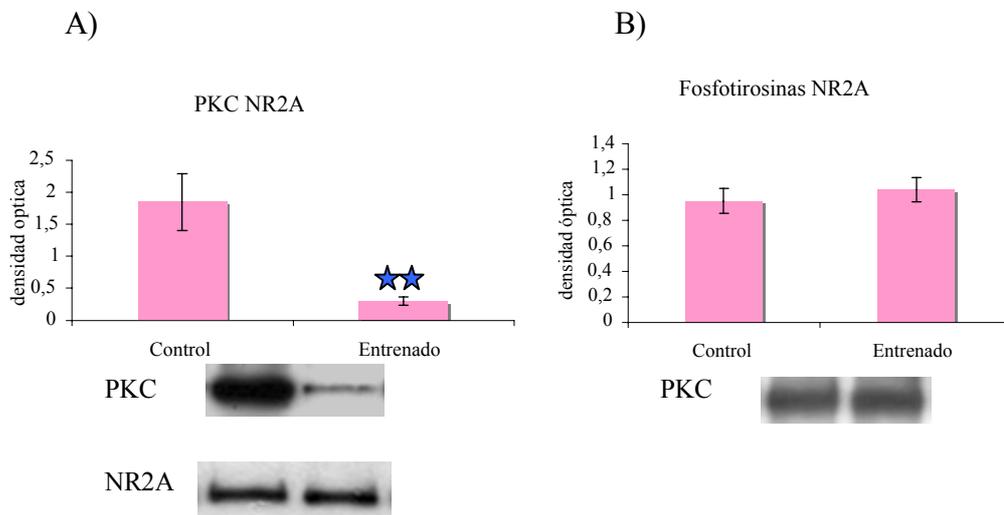


Figura 12. Asociación de PKC con las subunidades NR2A y fosforilación de NR2A. A) Análisis densitométrico e inmunoblot representativo donde se analizó la co-inmunoprecipitación de PKC con la subunidades NR2A. Los resultados son expresados como la inmunoreactividad de PKC / NR2A. B) Análisis densitométrico e inmunoblot representativo donde se analizó la fosforilación en tirosinas de la subunidad NR2A. Los resultados son expresados como inmunoreactividad de la fosforilación de NR2A / NR2A. Todos los resultados son expresados como promedio \pm error estándar (grupo control n=11, grupo entrenado n=10, **p = 0.004)

La subunidad NR2B no muestra cambios significativos en su asociación con PKC (Figura 13B). Aunque se ve una tendencia a aumentar en el grupo entrenado. En el laboratorio ya se había realizado inmunoprecipitación de la subunidad NR2B y se demostró que la fosforilación en tirosinas totales no cambia en los grupos control y entrenado. Sin embargo, debido a que resultados del laboratorio mostraron un incremento de la fosforilación en la tirosina 1472 en corteza insular, y a que se ha reportado que es muy importante en la regulación del receptor NMDA (Nakazawa *et al.*, 2002), se analizó si había cambios en la fosforilación específica de este residuo de tirosina entre los 2 grupos. No se observaron cambios en la fosforilación en la tirosina 1472 entre el grupo control y el grupo entrenado (Figura 13B).

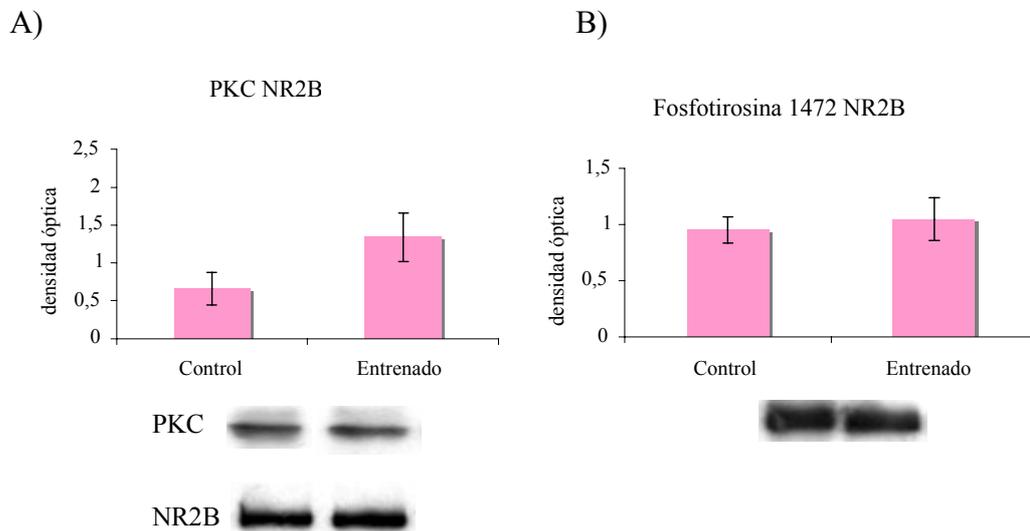
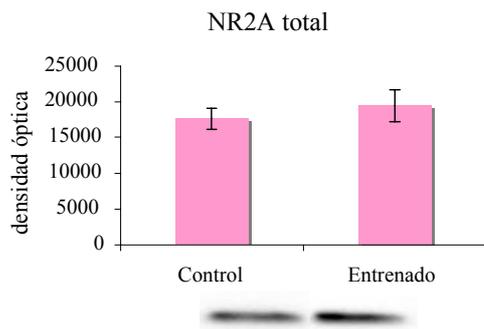


Figura 13. Asociación de PKC con las subunidades NR2B y fosforilación de la tirosina 1472 de NR2B. A) Análisis densitométrico e inmunoblot representativo donde se analizó la co-inmunoprecipitación de PKC con las subunidades NR2B. Los resultados son expresados como la inmunoreactividad de PKC / NR2B. B) Análisis densitométrico e inmunoblot representativo donde se analizó la fosforilación en la tirosina 1472 de la subunidad NR2B (PY1472). Los resultados son expresados como inmunoreactividad de PY1472 / NR2B. Todos los resultados son expresados como promedio \pm error estándar (grupo control n=1, grupo entrenado n=10, no hay cambios significativos $p > 0.05$)

A)



B)

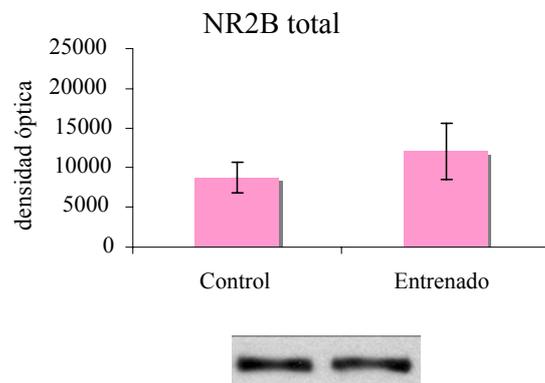


Figura 14. Cantidad total de NR2A y NR2B no cambia con el entrenamiento. Análisis densitométrico y blot representativo contra (A) NR2A (Control: n = 3, Entrenado: n = 2) y (B) NR2B (n = 7). Todos los resultados son expresados como promedio \pm error estándar.

DISCUSIÓN

Los lipid rafts participan en diferentes vías de señalización; como la transducción de señales de factores de crecimiento, guiado axonal, tráfico vesicular y proteólisis asociada a la membrana (Tsui-Pierchala *et al.*, 2002). Los resultados obtenidos sugieren que el movimiento de proteínas como el receptor NMDA y la PKC hacia los microdominios de membrana pudiera ser uno de los primeros eventos que se llevan a cabo en el hipocampo cuando un animal, en este caso la rata aprende una tarea espacial.

Los resultados muestran que PKC se transloca a los microdominios de membrana en el hipocampo después del entrenamiento en el laberinto acuático, igual que las subunidades NR1 y NR2A. El receptor NMDA se encuentra altamente regulado, y como ya se mencionó uno de sus mecanismos de regulación es su entrada al lipid raft (Besshoh *et al.*, 2005; Abulrob *et al.*, 2005). Estos reportes proponen que el receptor se introduce al lipid raft para hacer más eficiente la señalización. Debido a que la PKC es capaz de fosforilar al receptor NMDA, tiene sentido que esta proteína se transloque a los microdominios de membrana al igual que el receptor, pues ya se ha reportado que PKC se asocia a estos microdominios de manera dependiente de su activación (Orito *et al.*, 2001).

Los resultados muestran que la cantidad de PKC en la fracción 5 del gradiente de sacarosa, también cambia después del entrenamiento en el laberinto acuático. Se observa un incremento en la cantidad de PKC en el grupo entrenado. Se ha reportado que la PKC se asocia a microtúbulos y microfilamentos de actina después de su activación (Nakhost *et al.*, 2002). Es posible que este incremento pueda deberse a un aumento de la asociación de PKC con el citoesqueleto, ya que el citoesqueleto tampoco es soluble en detergentes no iónicos como el Triton X-100, y por su densidad éste se encuentra en la fracción 5 (en este protocolo) al aislar los microdominios.

Los resultados de la inmunoprecipitación del receptor muestran que la PKC se encuentra más asociada a los receptores que contienen la subunidad NR2A en las ratas control. Se ha reportado que la PKC puede potenciar al receptor de diversas formas (Xiong *et al.*, 1998; Grosshans *et al.*, 2001; Chen, 1992; Lan *et al.*, 2001), sin embargo también existen evidencias de que la proteína cinasa C puede regular negativamente al receptor NMDA fosforilando directamente a NR1 en serinas específicas (Markham, Segal, 1991; Tingley *et al.*, 1997). Markham y Segal reportaron que al aplicar el

activador de PKC, OAG (1-oleoyl-2-acetyl glycerol) en neuronas hipocámpales de CA1 disminuye la amplitud de la respuesta al NMDA activo (Markram, Segal 1991). Tingley y colaboradores demostraron en rebanadas de hipocampo que en condiciones basales la serina 890 de la subunidad NR1 del receptor NMDA, está más fosforilada que la serina 896 (Tingley *et al.*, 1997), esto sugiere hay una participación diferencial de estos residuos. Los receptores NMDA pueden formar agrupaciones (clusters) en la membrana plasmática (O'Brien *et al.*, 1998). La fosforilación de la serina 890 de NR1 genera la desagrupación de estos receptores mientras que la fosforilación del residuo de serina 897 no tiene efecto en la desagrupación (Tingley *et al.*, 1997).

Probablemente la diferencia entre los resultados que indican que la PKC potencia o inhibe al receptor se deban a las diferentes isoformas que existen de dicha cinasa. Se cree que la especificidad de acción de cada isoforma de PKC es debido a su translocación a sitios particulares y su interacción con diferentes proteínas. (Sánchez-Pérez, Felipe 2005).

Se ha reportado que los sitios de fosforilación de PKC en la subunidad NR1 no son fosforilados por las mismas isoformas de PKC (Sánchez-Pérez, Felipe 2005). Estudios realizados en cultivos de células cerebelares demostraron que la PKC α fosforila preferencialmente la serina 896, mientras que la PKC γ la serina 890 de la subunidad NR1 del receptor NMDA (Sánchez-Pérez, Felipe, 2005).

Estos resultados sugieren que el decremento en la asociación entre la PKC y el receptor NMDA (NR1-NR2A) se debe a que el entrenamiento genera la liberación de glutamato, esto activa a receptores glutamatérgicos incluyendo al NMDA. La PKC γ se disocia del receptor, y así la serina 890 queda desfosforilada y el receptor puede moverse a otras regiones de la membrana, quizá a los lipid rafts. En nuestro laboratorio ya se ha visto que después del entrenamiento la subunidades del receptor NMDA, NR1 y NR2A se translocan a los lipid rafts. Por lo que se mencionó anteriormente, la isoforma de PKC que migra a los microdominios y la disocia del receptor podrían ser diferentes. Es posible que PKC γ , se libere del receptor para permitir su movimiento y que PKC α se introduzca al raft para hacer más eficiente la señalización durante el proceso de adquisición de la tarea, ya que se ha reportado que PKC α es introducido al raft

de manera dependiente de calcio (Orito *et al.*, 2001). Ambas isoformas están presentes en el hipocampo (Saito, Shirai 2002).

Por otro lado los resultados muestran que la regulación que ejerce PKC en los receptores NMDA no es sobre la fosforilación en residuos de tirosina de las subunidades 2A y 2B. Existen evidencias de que PKC puede inducir la fosforilación de las subunidades NR2A y NR2B mediante cinasas de la familia de SRC (Grosshans, Browning 2001, MacDonald *et al.*, 2001), pero los resultados sugieren que en esta tarea no ocurre así. Estos resultados concuerdan con lo que ya se ha reportado en otras tareas espaciales, la fosforilación en tirosinas del receptor NMDA no cambia hasta después de 8 días de entrenamiento (Mizuno *et al.*, 2003).

Los ensayos de inmunoprecipitación de NR2A o NR2B permite la precipitación de todo el complejo del receptor NMDA, lo que permite detectar la subunidad NR1. Sin embargo en experimentos posteriores se realizará la inmunoprecipitación de la subunidad NR1 de manera específica y ver su asociación con las diferentes isoformas de PKC.

A futuro también sería interesante realizar experimentos para comprobar que isoforma o isoformas de PKC son las que migran al raft después del entrenamiento en el water maze y cuáles son las que se disocian del receptor NMDA. También sería necesario diseñar un protocolo para inmunoprecipitar al receptor NMDA que se encuentra en los microdominios, de esta forma sería posible analizar los cambios en la asociación del receptor con PKC dentro del lipid raft y fuera de él.

También faltaría hacer la inmunoprecipitación de la subunidad NR1 y ver su asociación con las diferentes isoformas de PKC.

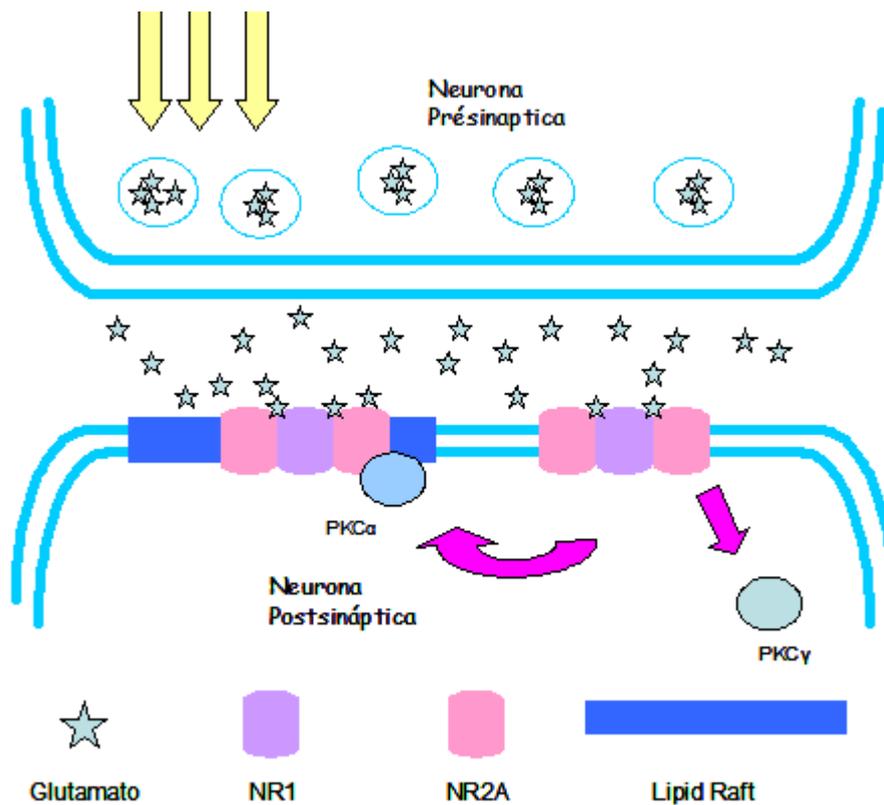


Figura 15. Modelo de la participación de PKC en el aprendizaje espacial en el hipocampo. El entrenamiento genera la liberación de glutamato, la membrana se despolariza y el neurotransmisor se une al receptor NMDA. PKC γ se separa del receptor y éste migra al lipid raft, el calcio intracelular aumenta y PKC α se transloca al lipid raft para hacer mas eficiente la señalización del receptor NMDA o de alguna otra proteína. Lo cual probablemente active cascadas que lleven a la formación de la memoria.

CONCLUSIONES

Durante el aprendizaje del laberinto acuático en ratas, la proteína cinasa C se mueve hacia los microdominios de membrana conocidos como “lipid rafts”.

La asociación de PKC con el receptor NMDA depende entre otras cosas de cuáles son las subunidades del receptor NMDA que lo componen. En este caso vimos que la asociación de PKC con el receptor es diferente en las subunidades NR2A y NR2B. La asociación de PKC con los receptores que presentan la subunidad NR2A cambia con el entrenamiento, mientras que su asociación con receptores con subunidades NR2B permanece igual.

No detectamos cambios en la fosforilación en tirosinas del receptor NMDA lo cual sugiere que PKC no está regulando esta fosforilación durante el aprendizaje de esta tarea.

TABLA DE ABREVIATURAS

AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
ATP	Adenosin Trifosfato
PKA	Proteína Cinasa A
PKC	Proteína Cinasa C
CA	Cuerno de Amón
LTP	Potenciación a largo plazo
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionate
NMDA	N-methyl-D-aspartate
Na ⁺	Sodio
Ca ²⁺	Calcio
Zn ²⁺	Zinc
AP5	2-amino-5-phosphonopentanoate
GDP	Guanosin difosfato
GTP	Guanosin trifosfato
PLC β	Fosfolipasa C- β
[PI (4,5)P ₂]	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
DAG	Diacilglicerol
PMA	Phorbol 12-myristate 13- acetate
PMB	Polymyxin B
TPA	12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate
OAG	1-oleoyl-2-acetyl glycerol
PdBu	Phorbol 12, 13-dibutyrate

BIBLIOGRAFÍA

- Abe H, Ishida Y, Iwasaki T. Perirhinal N-methyl-D-aspartate and muscarinic systems participate in object recognition in rats. *Neurosci Lett*. 2004 Feb 19; 356(3):191-4.
- Abraham W, Williams J, 2003, Properties and Mechanisms of LTP Maintenance, Vol9, Num 6
- Abulrob A, Tauskela JS, Mealing G, Brunette E, Faid K, Stanimirovic D. Protection by cholesterol-extracting cyclodextrins: a role for N-methyl-D-aspartate receptor redistribution. *J Neurochem*. 2005 Mar; 92(6):1477-86.
- Alberts B, Jonson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, 2002, Molecular Biology of the Cell, 4th Edition, USA.
- Amadio M, Battaini F, Pascale A. The different facets of protein kinases C: old and new players in neuronal signal transduction pathways. *Pharmacol Res*. 2006 Nov; 54 (5):317-25.
- Atkinson RC, Shiffrin RM. Human memory: a proposed system and its control processes. In: Spence, editor. *The psychology of learning and motivation: advances in research and theory*. New York, NY: Academy Press; 1968.
- Becher A, White JH, McIlhinney RA. The gamma-aminobutyric acid receptor B, but not the metabotropic glutamate receptor type-1, associates with lipid rafts in the rat cerebellum. *J Neurochem*. 2001 Nov; 79 (4):787-95.
- Bermúdez-Rattoni F; Prado Alcalá R, 2001, Memoria: dónde reside y cómo se forma, Ed Trillas
- Besshoh S, Bawa D, Teves L, Wallace MC, Gurd JW. Increased phosphorylation and redistribution of NMDA receptors between synaptic lipid rafts and post-synaptic densities following transient global ischemia in the rat brain. *J Neurochem*. 2005 Apr; 93(1):186-94.
- Bi K, Tanaka Y, Coudronniere N, Sugie K, Hong S, van Stipdonk MJ, Altman A. Antigen-induced translocation of PKC-theta to membrane rafts is required for T cell activation. *Nat Immunol*. 2001 Jun; 2(6):556-63.
- Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*. 1973 Jul; 232(2):331-56.
- Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 1993 Jan 7; 361(6407):31-9.
- Bonini JS, Da Silva WC, Bevilacqua LR, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. On the participation of hippocampal PKC in acquisition, consolidation and reconsolidation of spatial memory. *Neuroscience*. 2007 Jun 15; 147(1):37-45.
- Botto L, Masserini M, Palestini P. Changes in the composition of detergent-resistant membrane domains of cultured neurons following protein kinase C activation. *J Neurosci Res*. 2007 Feb 1; 85(2):443-50.
- Brown DA, London E. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem*. 2000 Jun 9; 275(23):17221-4.
- Carroll, R. C., Nicoll, R. A. & Malenka, R. C. Effects of PKA and PKC on miniature excitatory postsynaptic currents in CA1 pyramidal cells. *J Neurophysiol*. 80, 2797–2800 (1998)
- Chen, L. & Huang, L. Y. Protein kinase C reduces Mg²⁺ block of NMDA receptor channels as a mechanism of modulation. *Nature* 356, 521–523 (1992)
- Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol*. 2001 Jun; 11(3):327-35.
- D'Hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Brain Res Rev*. 2001 Aug; 36(1):60-90.
- Dumas TC. Developmental regulation of cognitive abilities: modified composition of a molecular switch turns on associative learning. *Prog Neurobiol*. 2005 Jun; 76(3): 189-211.
- Eichenbaum H. Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron*. 2004 Sep 30; 44(1):109-20.
- Groc L, Heine M, Cognet L, Brickley K, Stephenson FA, Lounis B, Choquet D. Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors. *Nat Neurosci*. 2004 Jul; 7(7):695-6. Epub 2004 Jun 20.
- Grosshans DR, Browning MD. Protein kinase C activation induces tyrosine phosphorylation of the NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor. *J Neurochem*. 2001 Feb; 76(3):737-44
- Guirland C, Suzuki S, Kojima M, Lu B, Zheng JQ. Lipid rafts mediate chemotropic guidance of nerve growth cones. *Neuron*. 2004 Apr 8; 42(1):51-62. Erratum in: *Neuron*. 2004 May 13; 42(3): 519.

- Gutierrez H, Hernandez-Echeagaray E, Ramirez-Amaya V, Bermudez-Rattoni F. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors in the insular cortex disrupts taste aversion and spatial memory formation. *Neuroscience*. 1999 Mar;89(3):751-8
- Harder, T., Scheiffele, P., Verkade, P., Simons, K., 1998. Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J. Cell Biol.* 141, 929-942.
- Hering H, Lin CC, Sheng M. Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *J Neurosci*. 2003 Apr 15;23(8):3262-71.
- Hu GY, Hvalby O, Walaas SI, Albert KA, Skjeflo P, Andersen P, Greengard P. Protein kinase C injection into hippocampal pyramidal cells elicits features of long term potentiation. *Nature*. 1987 Jul 30-Aug 5;328 (6129):426-9.
- Jacobson K, Mouritsen OG, Anderson RG. Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. *Nat Cell Biol*. 2007 Jan;9(1):7-14.
- Kandel E. The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses. *Biosci Rep*. 2001 Oct;21(5):565-611.
- Kandel ER, Hawkins RD. The biological basis of learning and individuality. *Sci Am*. 1992 Sep;267(3):78-86.
- Kandel ER, O'Dell TJ. Are adult learning mechanisms also used for development? *Science*. 1992 Oct 9; 258(5080):243-5.
- Kandel Eric R., Schwartz James, Jessell Thomas. 2000, *Principles of Neural Science*. Fourth Edition, New York, McGraw-Hill.
- Kandel E, Squire L, 2000, Memory: From Mind to Molecules, Scientific American Library, New York
- Lan JY, Skeberdis VA, Jover T, Grooms SY, Lin Y, Araneda RC, Zheng X, Bennett MV, Zukin RS. Protein kinase C modulates NMDA receptor trafficking and gating. *Nat Neurosci*. 2001 Apr;4(4):382-90.
- Lu WY, Xiong ZG, Lei S, Orser BA, Dudek E, Browning MD, MacDonald JF. G-protein-coupled receptors act via protein kinase C and Src to regulate NMDA receptors. *Nat Neurosci*. 1999 Apr; 2(4):331-8.
- Malinow, R., Schulman, H. & Tsien, R. W. Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science* 245, 862–866 (1989).
- Ma L, Huang YZ, Pitcher GM, Valtschanoff JG, Ma YH, Feng LY, Lu B, Xiong WC, Salter MW, Weinberg RJ, Mei L. Ligand-dependent recruitment of the ErbB4 signaling complex into neuronal lipid rafts. *J Neurosci*. 2003 Apr 15;23(8):3164-75
- MacDonald JF, Kotecha SA, Lu WY, Jackson MF. Convergence of PKC-dependent kinase signal cascades on NMDA receptors. *Curr Drug Targets*. 2001 Sep;2(3):299-312.
- Martin SJ, Clark RE. The rodent hippocampus and spatial memory: from synapses to systems. *Cell Mol Life Sci*. 2007 Feb;64(4):401-31.
- McDonald RJ, Hong NS, Devan BD. The challenges of understanding mammalian cognition and memory-based behaviours: an interactive learning and memory systems approach. *Neurosci Biobehav Rev*. 2004 Nov;28(7):719-45.
- McHugh SB, Niewoehner B, Rawlins JN, Bannerman DM. Dorsal hippocampal N-methyl-d-aspartate receptors underlie spatial working memory performance during non-matching to place testing on the T-maze. *Behav Brain Res*. 2007 Jul 21
- Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*. 1982 Jun 24;297(5868):681-3.
- Morris RG. Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *J Neurosci*. 1989 Sep;9(9):3040-57.
- Mukherjee A, Arnaud L, Cooper JA. Lipid-dependent recruitment of neuronal Src to lipid rafts in the brain. *J Biol Chem*. 2003 Oct 17;278(42):40806-14.
- Nakazawa T, Tezuka T, Yamamoto T. Regulation of NMDA receptor function by Fyn-mediated tyrosine phosphorylation. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*. 2002 Oct;22(5):165-7.
- Nakhost A, Kabir N, Forscher P, Sossin WS. Protein kinase C isoforms are translocated to microtubules in neurons. *J Biol Chem*. 2002 Oct 25;277(43):40633-9.
- Nerad L, Ramirez-Amaya V, Ormsby CE, Bermudez-Rattoni F. Differential effects of anterior and posterior insular cortex lesions on the acquisition of conditioned taste aversion and spatial learning. *Neurobiol Learn Mem*. 1996 Jul;66(1):44-50.
- Noguès X, Jaffard R, Micheau J. Investigations on the role of hippocampal protein kinase C on memory processes: pharmacological approach. *Behav Brain Res*. 1996 Feb;75(1-2):139-46.
- O'Brien RJ, Lau LF, Huganir RL. Molecular mechanisms of glutamate receptor clustering at

- excitatory synapses. *Curr Opin Neurobiol.* 1998 Jun;8(3):364-9.
- Orito A, Kumanogoh H, Yasaka K, Sokawa J, Hidaka H, Sokawa Y, Maekawa S. Calcium-dependent association of annexin VI, protein kinase C alpha, and neurocalcin alpha on the raft fraction derived from the synaptic plasma membrane of rat brain. *J Neurosci Res.* 2001 May 1;64(3):235-41.
 - Paylor R, Rudy JW, Wehner JM. Acute phorbol ester treatment improves spatial learning performance in rats. *Behav Brain Res.* 1991 Nov 26;45(2):189-93.
 - Pinel J, 2001, Biopsicología, Pearson Educación S.A., Madrid, 4º edición, 637 pp.
 - Pittenger C, Kandel ER. In search of general mechanisms for long-lasting plasticity: *Aplysia* and the hippocampus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2003 Apr 29;358(1432):757-63.
 - Platenik J, Kuramoto N, Yoneda Y. Molecular mechanisms associated with long-term consolidation of the NMDA signals. *Life Sci.* 2000 Jun 16;67(4):335-64.
 - Ramirez JJ. The functional significance of lesion-induced plasticity of the hippocampal formation. *Adv Neurol.* 1997;73:61-82.
 - Ramos JM. Long-term spatial memory in rats with hippocampal lesions. *Eur J Neurosci.* 2000 Sep;12(9):3375-84
 - Roche KW, Tingley WG, Haganir RL. Glutamate receptor phosphorylation and synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol.* 1994 Jun;4(3):383-8.
 - Salamanca DA, Khalil RA. Protein kinase C isoforms as specific targets for modulation of vascular smooth muscle function in hypertension. *Biochem Pharmacol.* 2005 Nov 25;70(11):1537-47
 - Salter MW, Kalia LV. Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation. *Nat Rev Neurosci.* 2004 Apr;5(4):317-28.
 - Sacktor TC, Schwartz JH. Sensitizing stimuli cause translocation of protein kinase C in *Aplysia* sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Mar;87(5): 2036-9.
 - Sanchez-Perez AM, Felipe V. Serines 890 and 896 of the NMDA receptor subunit NR1 are differentially phosphorylated by protein kinase C isoforms. *Neurochem Int.* 2005 Jul;47(1-2):84-91.
 - Saito N, Shirai Y. Protein kinase C gamma (PKC gamma): function of neuron specific isotype. *J Biochem (Tokyo).* 2002 Nov;132(5):683-7.
 - Shu SY, Wu YM, Bao XM, Leonard B. Interaction among memory-related centers in the brain. *J Neurosci Res* 2003;71:609-16.
 - Squire LR. The organization and neural substrates of human memory. *Int J Neurol* 1987/1988;21/22:218-22.
 - Squire LR, Zola-Morgan S. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:13515-22.
 - Squire L, Kandel E, 2000, *From mind to molecules*, Scientific American Library, E.U.A
 - Suzuki T, Ito J, Takagi H, Saitoh F, Nawa H, Shimizu H. Biochemical evidence for localization of AMPA-type glutamate receptor subunits in the dendritic raft. *Brain Res Mol Brain Res.* 2001 Apr 18;89(1-2):20-8.
 - Suzuki T. Lipid rafts at postsynaptic sites: distribution, function and linkage to postsynaptic density. *Neurosci Res.* 2002 Sep;44(1):1-9.
 - Takebayashi M, Hayashi T, Su TP. Sigma-1 receptors potentiate epidermal growth factor signaling towards neuriteogenesis in PC12 cells: potential relation to lipid raft reconstitution. *Synapse.* 2004 Aug;53(2):90-103.
 - Tingley WG, Ehlers MD, Kameyama K, Doherty C, Ptak JB, Riley CT, Haganir RL. Characterization of protein kinase A and protein kinase C phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit using phosphorylation site-specific antibodies. *J Biol Chem.* 1997 Feb 21;272(8):5157-66.
 - Tooze SA, Martens GJ, Huttner WB. Secretory granule biogenesis: rafting to the SNARE. *Trends Cell Biol.* 2001 Mar; 11(3):116-22
 - Tsui-Pierchala BA, Encinas M, Milbrandt J, Johnson EM Jr. Lipid rafts in neuronal signaling and function. *Trends Neurosci.* 2002 Aug;25(8):412-7.
 - Voet, D., Voet, J., 2004, *Biochemistry, USA*, Wiley International Edition, 3rd edition, Chapter 12, p. 382
 - Wang YT, Salter MW. Regulation of NMDA receptors by tyrosine kinases and phosphatases. *Nature.* 1994 May 19; 369(6477):233-5.
 - Wang H, Hu Y, Tsien JZ. Molecular and systems mechanisms of memory consolidation and storage. *Prog Neurobiol.* 2006 Jun;79(3):123-35. Epub 2006 Aug 7.
 - Wehner JM, Sleight S, Upchurch M. Hippocampal protein kinase C activity is reduced in poor

- spatial learners. *Brain Res.* 1990 Jul 23;523(2):181-7
- ♣ Witter MP, Wouterlood FG, Naber PA, Van Haeften T. Anatomical organization of the parahippocampal-hippocampal network. *Ann N Y Acad Sci.* 2000 Jun;911:1-24.
 - ♣ Xiong, Z. G. *et al.* Regulation of N-methyl-D-aspartate receptor function by constitutively active protein kinase C. *Mol. Pharmacol.* 54, 1055–1063 (1998).
 - ♣ Yanagisawa M, Nakamura K, Taga T. Roles of lipid rafts in integrin-dependent adhesion and gp130 signalling pathway in mouse embryonic neural precursor cells. *Genes Cells.* 2004 Sep;9(9):801-
 - ♣ Zhao WQ, Waisman DM, Grimaldi M. Specific localization of the annexin II heterotetramer in brain lipid raft fractions and its changes in spatial learning. *J Neurochem.* 2004 Aug; 90(3): 609-20.