

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA PALMITOILACIÓN SOBRE LA FORMACIÓN
Y EL MANTENIMIENTO DE LA MEMORIA ESPACIAL**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:
OSCAR GIOVANNY URREGO MORALES**

**DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI
Instituto de Fisiología Celular**

**DRA. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ALVAREZ
Instituto de Investigaciones Biomédicas**

**DR. ERNESTO SOTO REYES SOLÍS
Instituto Nacional de Cancerología**

Ciudad de México. junio, 2018



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.

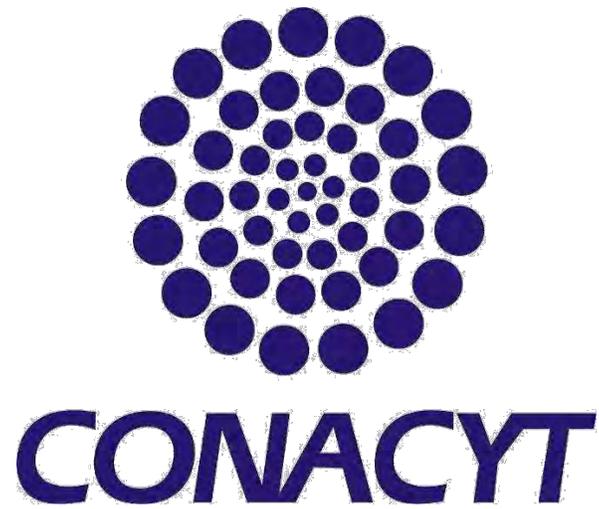
Los experimentos conductuales, análisis de proteínas e histología se realizaron en el Laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y la Memoria, en el Instituto de Fisiología Celular, Universidad Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Federico Bermúdez Rattoni, gracias al financiamiento otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, proyectos:

CONACYT 250870

CONACYT FOIINS 474

PAPIIT IN208616

También se agradece el apoyo de los técnicos Académicos Dra Perla Moreno Castilla y el Dr. Luis F. Rodríguez-Durán.



El alumno Oscar Giovanni Urrego Morales agradece al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por otorgar la beca nacional con el número de registro de becario 742407 que comprende del periodo: enero de 2016 hasta Julio 2018.

Tabla de Contenido

1. INTRODUCCIÓN	6
1.1 Memoria espacial	6
1.2 El hipocampo.....	7
1.3 Paradigmas conductuales para el estudio de la memoria espacial	10
1.4 Mecanismos moleculares de la memoria espacial	12
1.5 La palmitoilación.....	14
2. JUSTIFICACIÓN	19
3. HIPÓTESIS	20
4. OBJETIVOS	20
4.1 Objetivo general	20
4.2 Objetivos específicos.....	20
5. DISEÑO EXPERIMENTAL	21
6. MATERIALES Y MÉTODOS	22
6.1 Animales	22
6.2 Cirugía estereotáxica.....	22
6.3 Administración farmacológica.....	22
6.4 Laberinto acuático de Morris	24
6.5 Memoria de localización de objetos.....	25
6.6 Memoria de reconocimiento de objetos	26
6.7 Histología	26
6.8 Análisis estadístico	27
7. RESULTADOS	28
7.1 Determinación del sitio de inyección del fármaco	28
7.2 Inhibición de la palmitoilación en la adquisición.....	29
7.3 Inhibición de la palmitoilación en la consolidación	33
7.4 Inhibición de la palmitoilación en la evocación.....	39
8. DISCUSIÓN	43
9. CONCLUSIONES	46
10. BIBLIOGRAFIA	47

RESUMEN

Efecto de la inhibición de la palmitoilación sobre la formación y el mantenimiento de la memoria espacial

La palmitoilación de proteínas, definido como el mecanismo de adición del lípido palmitato, es una modificación post-traducciona que cambia la hidrofobicidad de las proteínas permitiendo la interacción con los lípidos de la membrana celular y membranas subcelulares, regulando la localización y la función de las proteínas. A nivel de sistema nervioso, la palmitoilación regula el tráfico vesicular y la localización de proteínas relevantes en procesos de plasticidad sináptica. Las aproximaciones genéticas y farmacológicas en modelos murinos han reportado la participación de la palmitoilación en los procesos de memoria espacial. Sin embargo, estas aproximaciones no evalúan el efecto de la palmitoilación durante las fases de la memoria espacial. Por lo tanto, en este trabajo se estudió la participación de la palmitoilación durante las tres fases de la memoria para entender un posible mecanismo regulador de las proteínas involucradas en los procesos de aprendizaje y memoria. Para esto se evaluó el efecto de la inhibición de las enzimas palmitoil-acil transferasas en el hipocampo dorsal con el fármaco 2-bromopalmitato de unión irreversible a estas enzimas. El fármaco se administró durante las tres fases de la memoria: adquisición, consolidación y evocación, en dos modelos conductuales de memoria espacial dependientes de hipocampo. Los resultados muestran que la inhibición de la palmitoilación afectó la adquisición y la consolidación, pero no la evocación de la memoria espacial. Estos resultados sugieren un posible mecanismo que necesita ser estudiado ampliamente. En conclusión, la palmitoilación de proteínas mediadas por las enzimas palmitoil-acil transferasas participa en la formación de la memoria espacial.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Memoria espacial

El aprendizaje es el proceso de adquisición de nueva información proveniente del ambiente (Kandel & Pittenger, 1990), mientras que la memoria es una red compleja de interacciones estructurales y funcionales que trabajan en conjunto para retener, almacenar y recuperar una amplia variedad de información relevante para un organismo (Sunyer *et al*, 2008; Carrillo-Mora *et al*, 2009).

En términos generales, la memoria se puede clasificar en dos grandes grupos: la memoria implícita que hace referencia a las habilidades motoras o perceptuales que se expresan a través de la ejecución y la memoria explícita que se refiere a los hechos y eventos autobiográficos. La memoria implícita es dependiente de estructuras como el cerebelo y la amígdala, mientras que la memoria explícita depende del hipocampo, lóbulo temporal y áreas corticales (Morgado, 2005; Ferretti *et al*, 2008).

La memoria espacial es la codificación, el almacenamiento y la expresión de información de la disposición relativa de los espacios o estímulos con respecto al individuo (Carrillo-Mora *et al*, 2009). Al igual que la mayoría de las memorias explícitas, la memoria espacial depende de estructuras del lóbulo temporal, especialmente el hipocampo.

Reportes clínicos, como el paciente Henry Molaison, quien sufrió daños en el hipocampo y las estructuras adyacentes al lóbulo temporal medial, ayudaron a identificar el papel de dichas estructuras en la memoria espacial, dado que presentaba problemas para recordar la localización de diversos objetos utilizados en su vida cotidiana (Smith, 1988). De igual forma, pacientes con lobotomía de las estructuras temporales reportaron déficit en la expresión de la memoria espacial (Maguire *et al*, 1996; Spiers *et al*, 2001; Bohbot *et al*, 2004).

Al igual que los reportes de casos clínicos, los estudios con modelos animales han permitido reforzar nuestro conocimiento sobre el papel del hipocampo en la memoria espacial. Nakazawa y colaboradores (2003) utilizando aproximaciones genéticas, mediante la generación de una cepa de ratón mutante en el gen que codifica para la subunidad 1 del receptor NMDA (NMDAR) de forma condicional en la región *Cornu ammonis* 3 (CA3) del hipocampo observó que los animales que expresan dicha mutación no logran aprender la información espacial. Además, diferentes reportes indican que la síntesis de proteínas en el hipocampo es necesaria para el establecimiento de la memoria espacial de largo plazo (Naghdi *et al*, 2003; Rossato *et al*, 2007) e incluso en las modificaciones de memorias previamente establecidas (Rodríguez-Ortiz *et al*, 2008) en condiciones fisiológicas normales o en modelos murinos patológicos de enfermedades asociadas a daños en el hipocampo, como la enfermedad de Alzheimer (Perusini *et al*, 2017).

Debido a que se define en términos de las relaciones espaciales del individuo, la información espacial se puede organizar de dos formas. La primera es, la estrategia egocéntrica en la cual el organismo en sí mismo se define como el punto central de referencia, y por lo tanto, todos los objetos o estímulos a su alrededor se posicionan respecto a su orientación con respecto al cuerpo del organismo (izquierda, derecha, arriba, abajo). La segunda es, la estrategia allocéntrica que depende de claves espaciales, en donde el organismo codifica la posición de un objeto o estímulo en relación a la disposición espacial de otros objetos independiente de la posición del cuerpo del organismo, por lo tanto, se trata de una representación espacial coordinada e independiente del observador (Klatzky R, 1998).

1.2 El hipocampo

El hipocampo es una estructura que hace parte de un complejo sistema de estructuras interconectadas, denominado sistema cortico-hipocampal (Eichenbaum, 2000), constituido por tres áreas principales: las estructuras corticales, que incluye prácticamente todas las áreas de asociación neocorticales incluyendo cortezas de asociación visual y visoespacial (Burwell & Amaral, 1998).

Las estructuras corticales están conectadas a su vez con diferentes subdivisiones de la región parahipocampal, que rodea al hipocampo, tales como la corteza postrhinal, que presenta neuronas que se activan con la entrada de información visoespacial, y la corteza perirhinal, que recopila información relacionada a la posición de un objeto o estímulo en el espacio para la asociación objeto-lugar en el hipocampo (Rendeiro *et al*, 2009); ambas estructuras funcionando como una región de convergencia de las proyecciones corticales, y dado que están interconectadas con diferentes estructuras hipocampales mediante la corteza entorhinal, tales como el giro dentado, las regiones *Cornu ammonis* 1 (CA1), CA3, y el subículum, distribuyen la información para el posterior procesamiento en el hipocampo. A su vez, el hipocampo envía la información a la región parahipocampal, redistribuyéndola a las estructuras corticales originales (figura 1) (Eichenbaum, 2000), y a otras estructuras subcorticales adicionales conectadas al hipocampo a través de un conjunto de fibras llamado fornix (Aggleton & Brown, 1999).

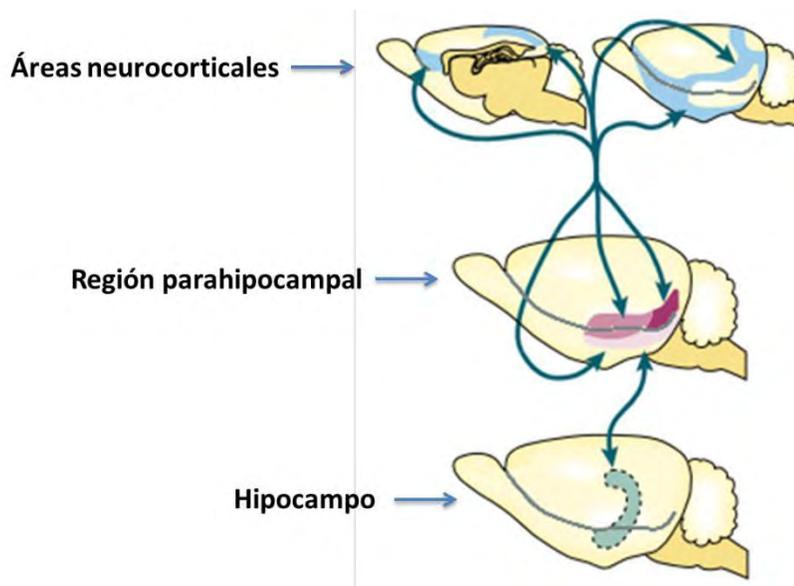


Figura 1. Sistema cortico-hipocampal en roedores. Las áreas de asociación neocorticales (en azul) reciben la información sensorial para ser distribuida a diferentes estructuras de la región parahipocampal (en púrpura), quien a su vez presenta proyecciones aferentes y eferentes con el hipocampo, donde se procesa la información y se redistribuye a las regiones neocorticales nuevamente. (Tomado y modificado de Eichenbaum, 2000).

El hipocampo presenta cuatro tipos funcionales de células que permiten la formación de mapas y representaciones espaciales. Las células de lugar son neuronas hipocámpales que se activan cada vez que el organismo presenta una posición específica en el ambiente. Las células de cuadrícula se activan en configuraciones específicas generando cuadrículas a diferentes escalas espaciales, por lo que al combinarse múltiples cuadrículas el animal puede decodificar su posición espacial (Solstad *et al*, 2006; Mathis *et al*, 2012); estas células están presentes en la corteza entorrinal (Hafting *et al*, 2005; Rendeiro *et al*, 2009), en el presubiculum y el parasubiculum del hipocampo (Boccaro *et al*, 2010). Las células de borde disparan únicamente cuando el animal se localiza en los bordes del plano espacial generando representaciones geométricas de los mapas espaciales (Solstad *et al*, 2008; Geva-Sagiv *et al*, 2015) y están localizadas principalmente en la corteza entorrinal y el subiculum hipocámpal. El último grupo de células denominadas células de direccionamiento se activan cuando el animal apunta su cabeza en dirección al objeto o estímulo en relación con el espacio que permiten mantener el sentido de dirección interno y se encuentran en el subiculum dorsal del hipocampo (Taube *et al*, 1990; Yoganarasimha & Knierim, 2006).

Al estar conectadas con regiones corticales, la región CA1 del hipocampo sirve como estructura importante en la entrada y salida de información (Ocampo *et al*, 2018), siendo relevante durante la adquisición y codificación de la memoria espacial. Se ha reportado que la región CA1 es necesaria para la consolidación de la memoria espacial (Naghdi *et al*, 2003). Por otra parte, las modificaciones en las sinapsis del circuito CA1-CA3 son necesarias para la consolidación y evocación de la información espacial aprendida (figura 2). La región CA3 está altamente conectada con el giro dentado a través de las fibras musgosas, y este circuito juega un papel importante en la codificación de la información espacial proveniente de la corteza entorrinal, sin embargo, el circuito directo entre la corteza entorrinal y la región CA3 a través de la vía perforante, junto con el circuito CA3-CA1 son funcionalmente necesarios para la evocación de la memoria espacial (Rendeiro *et al*, 2009).

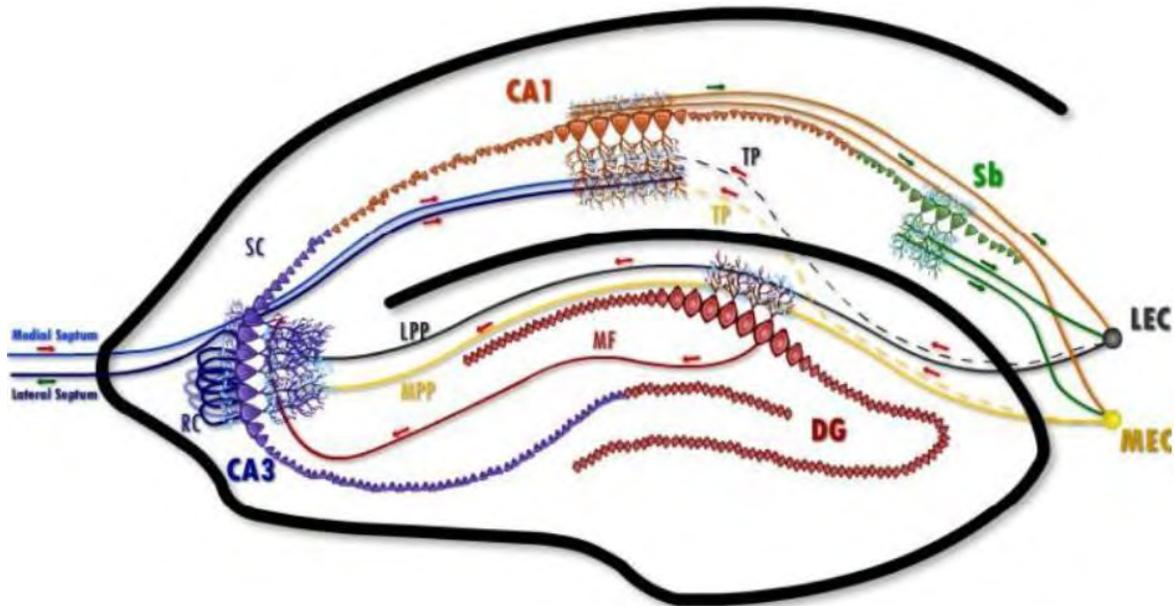


Figura 2. Estructuras hipocampales. Las neuronas de la capa II de la corteza entorhinal (EC) dividida en corteza entorhinal medial (MEC) y corteza entorhinal lateral (LEC) conectan directamente con el giro dentado (DG) y las células piramidales de la región CA3 a través de la vía perforante y con las células piramidales de la región CA1 a través de la vía temporoanómica (TP). El giro dentado (DG) conecta a su vez con las células piramidales de la región CA3 a través de las fibras musgosas (MF), y las células piramidales conectan con las células piramidales de la región CA1 a través de las colaterales de Schaffer. La región CA1 presenta proyecciones hacia la corteza entorhinal mediado por las células piramidales de la región subicular (Sb) (Tomado de Rendeiro *et al*, 2009).

1.3 Paradigmas conductuales para el estudio de la memoria espacial

Son muchos los modelos conductuales que se han propuesto para el estudio de la memoria espacial, siendo posible identificar diferentes estructuras cerebrales y procesos involucrados en la formación y el mantenimiento de la memoria espacial. Dos de los modelos que han sido desarrollados para el estudio de la memoria espacial dependiente del hipocampo son el laberinto acuático de Morris y la prueba de localización de objetos.

- **Laberinto acuático de Morris**

El laberinto acuático de Morris fue propuesto por Richard Morris en 1984 como un paradigma de memoria espacial dependiente del hipocampo (Morris, 1984). En este modelo conductual, el agua de una piscina circular es oscurecida, de tal forma que esconda una plataforma sumergida uno o dos centímetros por debajo del nivel del agua. Dentro y fuera de la piscina hay una serie de claves espaciales para que la navegación del animal sea eficiente. Los animales son entrenados iniciando el nado desde diferentes puntos espaciales de la piscina, de tal forma que se estimula el uso de estrategias espaciales para la localización de la plataforma. Existen muchas versiones de este laberinto, y los días de entrenamiento cambian dependiendo de los intereses de investigación. El día de prueba, la plataforma es removida, y los animales son puestos a nadar y se registran los tiempos que el animal requiere para localizar y llegar al sitio o el cuadrante donde se encontraba la plataforma durante la fase de entrenamiento (Vorhees & Williams, 2006; Bimonte-Nelson, 2015).

Además del hipocampo, se han identificado la participación de ciertas estructuras corticales como la corteza entorhinal, la corteza perirhinal y la corteza prefrontal en la formación y el mantenimiento de la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris, junto con la participación del neurotransmisor glutamato y los receptores NMDA y AMPA (Liang *et al*, 1994).

- **Memoria de localización de objetos**

El paradigma de localización de objetos se fundamenta en la naturaleza exploratoria de objetos o estímulos novedosos por parte de los sujetos. Este modelo de memoria espacial consiste de tres fases: habituación, donde los sujetos son expuestos a un contexto novedoso por varios días, de tal forma que se pierda la novedad del contexto y el estrés asociado a él, estimulando la conducta exploratoria por los objetos de interés. La adquisición, en donde se le presentan a los sujetos experimentales dos objetos idénticos para que sean explorados. Debido a la novedad de la posición de los dos objetos, se espera que el tiempo de exploración sea relativamente similar. Durante la fase de prueba, uno de los objetos cambia de posición en el campo abierto. Si los sujetos experimentales recuerdan la posición

de los objetos durante la fase de adquisición, se espera que exploren de manera preferencial el objeto en posición nueva (Barker & Warburton, 2011, Vogel-Ciernia & Wood, 2014).

Hay dos componentes principales en este grupo de paradigma conductual. La familiaridad del objeto en sí mismo, componente que se estudia al cambiar uno de los objetos durante la fase de adquisición por un objeto novedoso, pero sin cambiar su posición, denominado memoria de reconocimiento de objetos (ORM, por sus siglas en inglés), en el cual diversos estudios han reportado que el hipocampo no tiene participación (Winters *et al*, 2004; Good *et al*, 2007; Balderas *et al*, 2008; Langston & Wood, 2010). El segundo componente, el contexto, de naturaleza espacial y temporal, se estudia cuando se cambia la localización de uno de los objetos, el contexto o el orden de presentación de los objetos durante la fase de prueba. Cuando se estudia el componente contextual, se ha reportado un papel relevante del hipocampo en el reconocimiento de la novedad (Bussey *et al* 2000, Fortin *et al*, 2002; Balderas *et al*, 2008, Barker & Warburton, 2011).

1.4 Mecanismos moleculares de la memoria espacial

En términos temporales y moleculares la memoria se puede clasificar en dos tipos: la memoria de corto y largo plazo. La memoria de corto plazo (STM, por sus siglas en inglés), que se forma rápidamente y la retención de la información puede durar minutos o algunas horas, requiriendo de cambios en las redes neuronales, tanto eléctricos como moleculares, proceso denominado plasticidad sináptica (Takeuchi *et al*, 2014), estos cambios son temporales y susceptibles a ser eliminados. Mientras que la memoria de largo plazo (LTM, por sus siglas en inglés), cuya duración varía de horas a días o incluso años, requiere de cambios plásticos más profundos y persistentes, en donde la síntesis de proteínas parece ser fundamental para la formación de nuevas conexiones sinápticas y el remodelamiento de la arquitectura neuronal (Morgado, 2005; Dudai, 2002).

En vertebrados la despolarización de la neurona postsináptica es debido a la entrada de un estímulo que promueve la liberación de glutamato por parte de la neurona presináptica, mecanismo que permite el aprendizaje de una asociación o

la formación de una memoria espacial, fase denominada adquisición (Abel & Lattal, 2001). El glutamato liberado se une a los receptores N-metil-D-aspartato (NMDAR) y los receptores α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA). El receptor AMPA se abre rápida e inmediatamente como respuesta al glutamato liberado, siendo permeable principalmente a los cationes sodio y potasio (figura 3) (Abel & Lattal, 2001; Riedel *et al*, 2003), permitiendo despolarizaciones locales que permiten la liberación del catión magnesio de los receptores NMDA, el cual, en unión con glutamato, se abre y permite la entrada de calcio. El aumento en calcio intracelular activa proteínas quinasa, como la proteína calcio calmodulina quinasa II (CamKII), la proteína quinasa C (PKC) y la proteína calcineurina. Además, la entrada de calcio o señales moduladoras, como dopamina, actúan activando y regulando la proteína adenilil ciclasa, aumentando los niveles de cAMP, que activa a la proteína quinasa A (PKA). Una vez activa, PKA se transloca al núcleo donde fosforila factores de transcripción, como la proteína de unión a elementos de respuesta a cAMP (CREB), que se unen a la región promotora de múltiples genes, promoviendo la síntesis de proteínas (figura 3), proceso denominado consolidación (Abel & Lattal, 2001) siendo importante para la formación de la memoria de largo plazo. La síntesis de proteínas permite la formación de nuevas espinas dendríticas y el aumento de vesículas para el tráfico de proteínas (Barco *et al*, 2006).

El acceso y la expresión conductual de un trazo de memoria previamente aprendido, denominado evocación, ha sido menos estudiado, dado que se ha considerado como un proceso pasivo, consecuencia de las modificaciones plásticas ocurridas durante la adquisición y la consolidación. Sin embargo, actualmente sabemos que muchos de los mecanismos asociados con la consolidación han sido implicados en la evocación. Además, el reclutamiento y activación del receptor AMPA en la neurona post-sináptica dependiente del receptor NMDA es necesario para la evocación (Ben Mamou *et al*, 2006; Lopez *et al*, 2015).

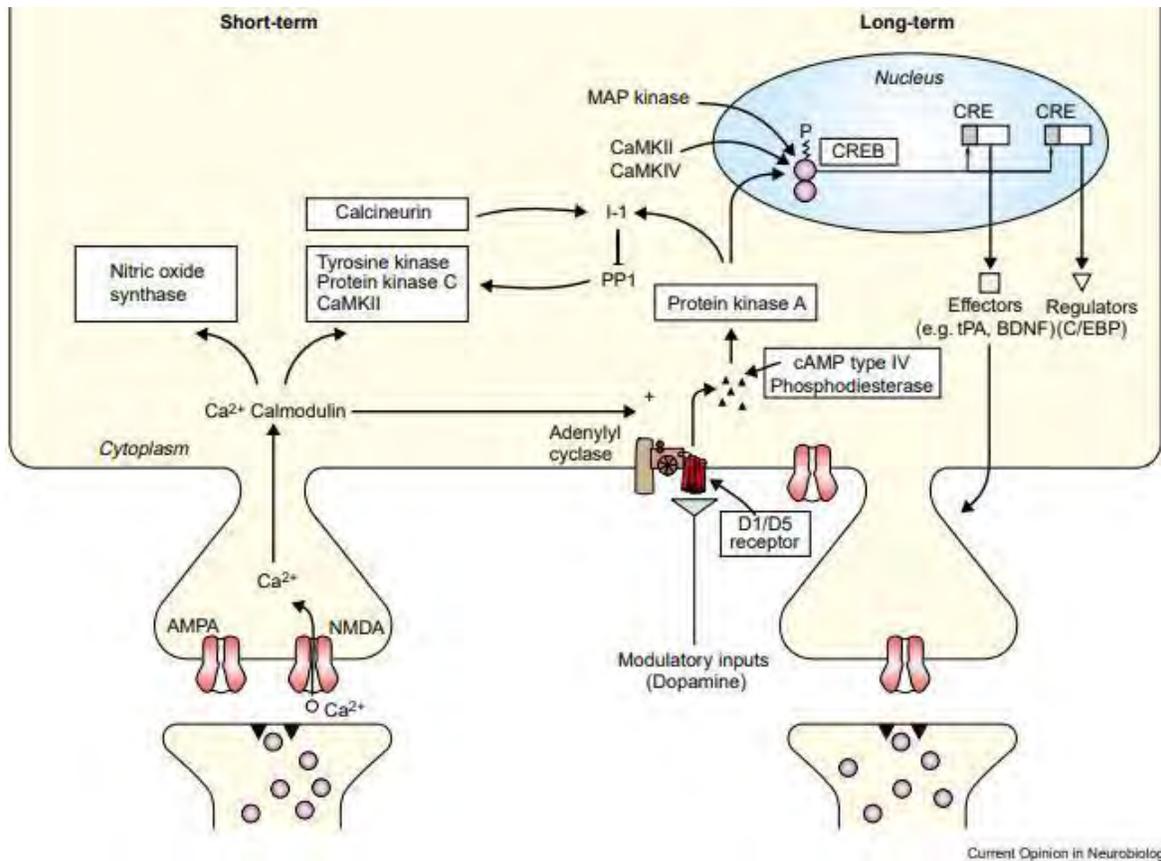


Figura 3. Mecanismos moleculares canónicos asociados a la memoria espacial. La entrada de un estímulo genera la liberación del neurotransmisor glutamato, que provoca la apertura de los receptores NMDA y AMPA, generando una despolarización y entrada de calcio en la neurona post-sináptica, promoviendo la activación de vías de señalización que generan cambios en la expresión génica y el remodelamiento de la arquitectura neuronal (Tomado de Abel & Lattal, 2001).

1.5 La palmitoilación

Las proteínas pueden ser modificadas mediante la adición de moléculas de diferente naturaleza, tanto de forma dinámica como estática, que funcionan como señales de localización y función proteica. Algunas de estas modificaciones, como la fosforilación, ha sido extensamente estudiada y caracterizada en su regulación y función celular (Salaun *et al*, 2010). Sin embargo, otro tipo de modificaciones, como la adición covalente de lípidos, no han sido completamente entendidos.

La modificación por adición de lípidos modifica la hidrofobicidad de las proteínas, cambiando su interacción con la membrana celular o su asociación intracelular (MonTERSINO & THOMAS, 2015). Además, la modificación por adición de lípidos es importante en señalización celular y ha sido considerada como un mecanismo importante en la plasticidad sináptica (Brigidi *et al*, 2014; Spinelli *et al*, 2017; Globa & Bamji, 2017).

La palmitoilación de proteínas es la unión entre la formación de un enlace tioéster de un residuo de cisteína de una proteína y el palmitato que es un lípido de 16 carbonos. La palmitoilación es una modificación lipídica que sirve para regular la unión de las proteínas a los diferentes compartimentos membranales de la célula y dirigir la localización dentro de los microdominios de membrana (Fukata *et al*, 2016). A diferencia de la adición de lípidos del grupo prenilo (prenilación) y del ácido mirístico (miristoilación), que son modificaciones irreversibles, la palmitoilación se distingue por su reversibilidad, por lo que la despalmitoilación es definida como la eliminación del ácido palmítico de los de los residuos de cisteína, parte de los mecanismos reguladores de la localización de las proteínas (Conibear & Davis, 2010).

Dado que la palmitoilación ocurre dentro de una amplia variedad de secuencias de aminoácidos, no se ha definido una secuencia consenso. Sin embargo, se sabe que existe una gran diversidad de enzimas encargadas de la palmitoilación, identificadas como proteínas palmitoil-acil transferasas (PATs, por sus siglas en inglés) con motivos DHHC (aspartato-histidina-histidina-cisteína) (Fukata *et al*, 2004; Huang *et al* 2004; Roth *et al*; 2006). En mamíferos, se han identificado 23 distintas proteínas palmitoil-acil transferasas que regulan los procesos de palmitoilación en la célula. Mientras que las enzimas prenil-transferasas y miristoil-transferasas son solubles y citoplasmáticas, las enzimas PATs son proteínas transmembranales con cuatro a seis dominios transmembranales, localizadas en los compartimentos endomembranales, como el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, y los endosomas (figura 4), pero también se han identificado a lo largo de la membrana plasmática (Ohno *et al*, 2006).

La palmitoilación al ser un proceso altamente dinámico y reversible, por lo que requiere de su mecanismo antagónico para lograr dicha reversibilidad. La despalmitoilación es considerada un proceso fundamental en la regulación de la localización y función de las proteínas asociadas a membranas. Las proteínas palmitoil-tioesterasa (PPT) son enzimas presentes en el citosol que eliminan los ácidos palmíticos de proteínas palmitoiladas (figura 4) que se encuentran localizadas fuera de sus sitios diana, promoviendo la repalmitoilación y relocalización en el sitio de interés (Rocks *et al*, 2010). Hasta el momento, solo tres enzimas acil-tioesterasa han sido identificadas: la proteína-acil tioesterasa 1 (APT1), la proteína-acil tioesterasa 2 (APT2) y la proteína parecida a acil-tioesterasa 1 (APTL1) (Lin & Conibear, 2015). Evidenciada por primera vez en 1993, a través del aislamiento y purificación de la proteína-acil tioesterasa 1 (APT1) a partir de homogenados de cerebros de bovinos (Camp & Hofmann, 1993), la APT1 ha sido descrita en mecanismos celulares involucrados en la localización y regulación funcional de proteínas en el sistema inmune, y junto a la proteína acil-tioesterasa 2 (APT2) son palmitoiladas en un residuo de cisteína en la región amino terminal, permitiéndoles una asociación transitorias con la membrana celular para la interacción con sus sustratos (Kong *et al*, 2013; Vartak *et al*, 2014).

A nivel de sistema nervioso, la palmitoilación también ha sido considerada un factor regulador importante de la plasticidad sináptica. Estos cambios son ejecutados de forma local alterando la localización del contenido proteico de las sinapsis individuales. Muchas proteínas sinápticas son palmitoiladas, sugiriendo que la palmitoilación y la despalmitoilación regulan el tráfico de proteínas hacia y desde las membranas sinápticas (figura 4) (Hanus & Ehlers, 2008; Fukata & Fukata, 2010). Algunos ejemplos de proteínas presinápticas palmitoiladas son las proteínas de fijación soluble de NSF (SNARE, por sus siglas en inglés) y la sinaptotagmina, que regulan la fusión vesicular durante la liberación de neurotransmisores en el espacio sináptico (Kang *et al*, 2008).

Muchas proteínas postsinápticas también son susceptibles a ser palmitoiladas, incluyendo a las proteínas de andamiaje como la proteína de la densidad postsináptica 95 (PSD-95) (Jeyifous *et al*, 2016), la proteína de anclaje kinasa-A (AKAP79) (Delint-Ramirez *et al*, 2015) y la proteína asociada a sinapsis 97 (SAP97) (Conibear & Davis, 2010) que coordinan las vías de señalización originadas en la membrana postsinápticas y a los receptores AMPAR y NMDAR.

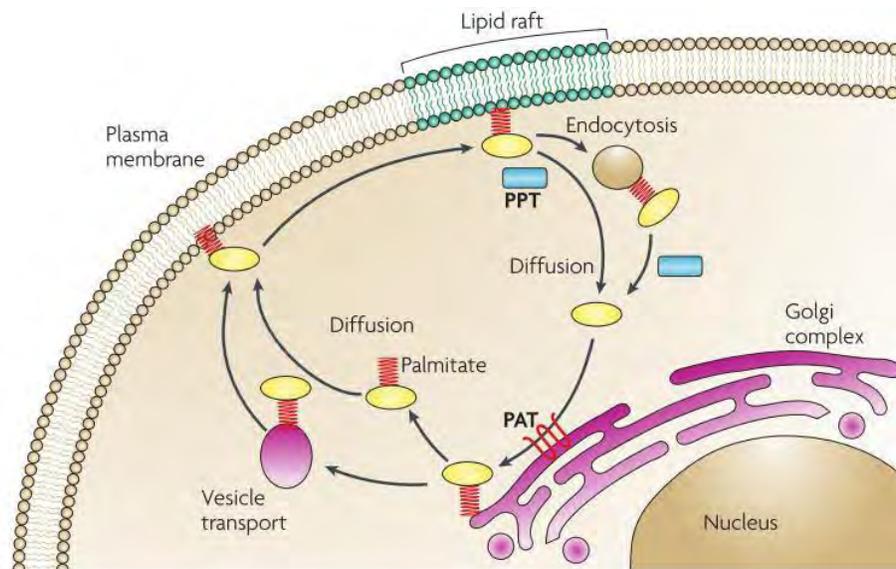


Figura 4. Control dinámico del tráfico vesicular, inserción de proteínas en la membrana celular y relocalización en los dominios de membrana por palmitoilación. Las enzimas palmitoilil-acil transferasa (PAT) adicionan moléculas de palmitato a las proteínas, incrementando la hidrofobicidad, y facilitando la interacción con lípidos. Las proteínas palmitoilil-tioesterasa (PPT) eliminan el grupo palmitato de las proteínas y permiten la endocitosis de proteínas transmembranales o la relocalización de las proteínas en la membrana celular. (Tomado de Fukata & Fukata, 2010).

En particular, la proteína PSD-95 funciona como anclaje de complejos proteicos durante la señalización celular que forman parte de los procesos de plasticidad sináptica, como de los receptores NMDA y AMPA en la membrana postsináptica, por lo cual ha sido ampliamente estudiada en el contexto de los procesos de la palmitoilación. Dado que el fortalecimiento y el aumento de tamaño de las sinapsis requiere de un mayor reclutamiento de la proteína PSD-95, la palmitoilación de

dicha proteína en la región N-terminal es requerida para su función de andamiaje en la membrana celular (Jeyifous *et al*, 2016), aumentando la tasa de palmitoilación de PSD-95 inmediatamente después de la estimulación excitatoria de la sinapsis. Mientras que una mayor estimulación excitatoria tiene efectos contrarios, incrementando la despalmilación de PSD-95 y reduciendo la cantidad de proteína PSD-95 en la post-sinapsis para reducir el fortalecimiento sináptico (El-Husseini *et al*, 2002). El incremento en la tasa de palmitoilación de PSD-95 correlaciona con una acumulación local de la enzima palmitoil acil-transferasa ZDHHC2, que se relocaliza en las espinas dendríticas como consecuencia de la actividad sináptica (Noritake *et al*, 2009), regulando la movilización en ambos sentidos de las regiones endosomales y membranales de las sinapsis y los compartimentos del Golgi localizados en el soma de las células neuronales (Conibear & Davis, 2010).

Adicional a la palmitoilación de las proteínas de andamiaje que son solubles e hidrofílicas, también existen evidencias de palmitoilación en las proteínas transmembranales, las cuales, dado que están embebidas dentro de la membrana celular, al ser palmitoiladas, alteran su conformación estructural cambiando el modo en que interactúan con los lípidos de la bicapa membranal (Bijlmakers & Marsh, 2003; McMichael *et al*, 2017; Globa & Bamji, 2017). Además de regular el tráfico vesicular de las proteínas membranales desde el aparato de Golgi hacia y desde la membrana celular, mecanismo que regula la inserción y recambio de proteínas en la membrana celular de la post-sinapsis (Hayashi *et al*, 2009; Fukata Fukata), también es considerado una señal de inserción en las balsas lipídicas, que son microdominios o regiones de la membrana celular ricos en esfingolípidos y colesterol, altamente dinámicos que favorecen el movimiento lateral de proteínas y la interacción proteína-proteína mediante la formación de complejos proteínicos para la señalización celular (Bhattacharyya *et al*, 2013; Helmunt & Levental, 2015).

2. JUSTIFICACIÓN

A nivel del sistema nervioso central, se ha sugerido que la palmitoilación tiene un papel regulador en la transmisión neuronal y la plasticidad sináptica, procesos que se asocian al aprendizaje y la memoria. Por un lado, las proteínas de ensamblaje, que coordinan las vías de señalización en la membrana post-sináptica gracias a su interacción con proteínas transmembranales y citoplasmáticas son palmitoiladas de forma directamente proporcional a la actividad neuronal, permitiendo su correcta interacción con la membrana celular para el remodelamiento neuronal (El-Husseini *et al*, 2002; Conibear & Davis, 2010; Delint-Ramirez *et al*, 2015; Jeyifous *et al*, 2016).

Por un lado, se sabe que mutaciones particulares en las proteínas palmitoil acil-transferasa (PAT) provocan un déficit cognitivo en ratones (Milnerwood *et al*, 2013). También se ha reportado que la inhibición de la palmitoilación a través del 2-bromopalmitato impide la palmitoilación del receptor AMPA y modifica la conducta motora de los animales (Van Dolah *et al*, 2011). Por otra parte, estudios previos sugieren que el aprendizaje espacial modifica la localización de las subunidades NR1 y NR2A en los diferentes dominios de membrana (Delint-Ramirez *et al*, 2008), proceso que puede ser controlado por palmitoilación (Bhattacharyya *et al*, 2013; Helmut & Levantal, 2015). A pesar de saber que la palmitoilación participa en todos estos procesos cognitivos; se desconoce si la palmitoilación es importante durante todo el proceso de formación y mantenimiento de la memoria o solo está involucrada en una fase específica de la misma. Por lo tanto, se propuso determinar el efecto de la inhibición de la palmitoilación mediante el uso de aproximaciones farmacológicas durante las tres fases de la memoria espacial usando dos paradigmas conductuales: el laberinto acuático de Morris y la memoria de localización de objetos.

3. HIPÓTESIS

La inhibición de la palmitoilación en el hipocampo dorsal impide la formación y mantenimiento de la memoria espacial.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar el efecto de la inhibición de la palmitoilación sobre la formación y el mantenimiento de la memoria espacial.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar los efectos de la inhibición de la palmitoilación sobre la adquisición de la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris y el paradigma de localización de objetos.
- Determinar los efectos de la inhibición de la palmitoilación sobre la consolidación de la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris y el paradigma de localización de objetos.
- Determinar los efectos de la inhibición de la palmitoilación sobre la evocación de la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris y el paradigma de localización de objetos.

5. DISEÑO EXPERIMENTAL

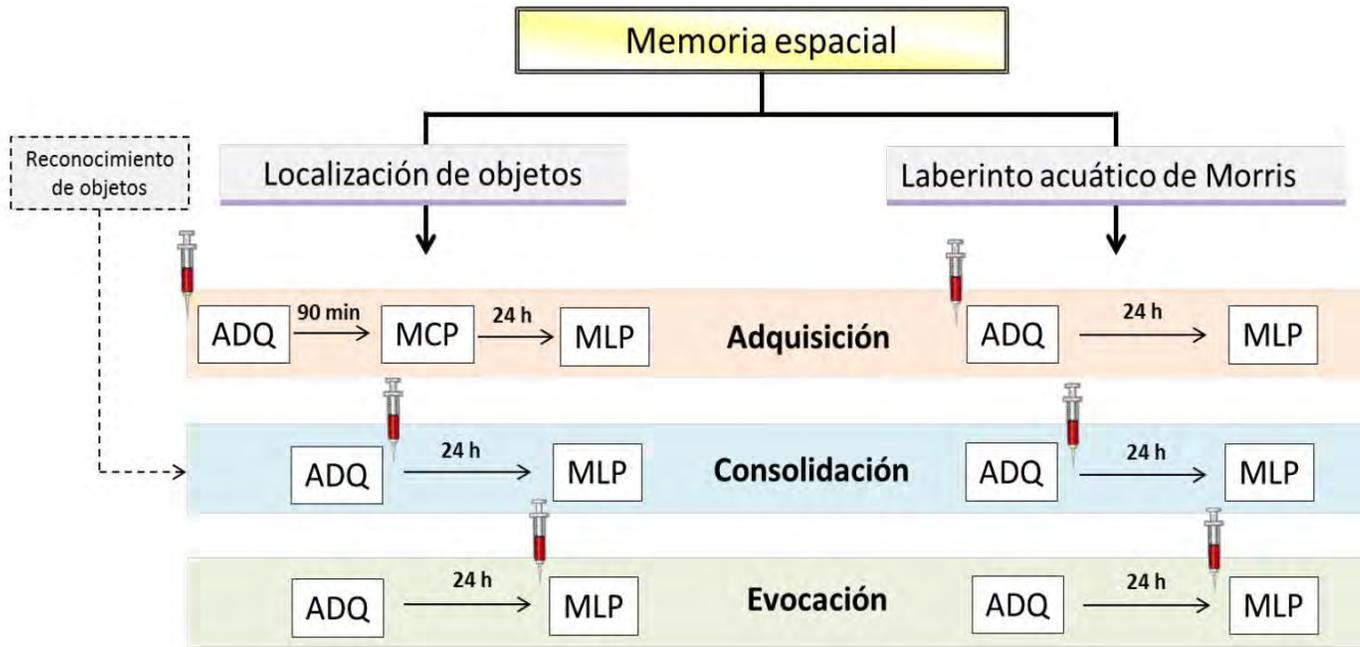


Figura 5. Determinación de los efectos de la inhibición de la palmitoilación sobre la formación y mantenimiento de la memoria espacial dependiente de hipocampo en dos paradigmas conductuales, localización de objetos y el laberinto acuático de Morris. Se trabajó una tarea conductual independiente de hipocampo como control que es el paradigma de reconocimiento de objetos. La inhibición de la palmitoilación se realizó durante la adquisición (ADQ), memoria de corto plazo (MCP) y memoria de largo plazo (MLP).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Animales

Los animales que se utilizaron fueron ratas machos de la cepa *Wistar* de dos meses de edad (250g). Las ratas provinieron del bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Durante su estancia en el *vivarium*, las ratas fueron alojadas individualmente en cajas de acrílico con libre acceso a comida y agua. Las condiciones de alojamiento fueron ciclo luz/oscuridad de 12/12 h, temperatura de 22 ± 2 °C, y humedad relativa de $50 \pm 5\%$. Todos los experimentos cumplieron los lineamientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) la cual establece las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, 2001).

6.2 Cirugía estereotáxica

Se realizaron canulaciones bilaterales en el hipocampo dorsal de acuerdo con el atlas del cerebro de rata (Paxinos & Watson, 1996). Los animales fueron anestesiados con una solución de xilacina (15 mg/kg) y ketamina (70mg/kg). Una vez anestesiado, el cráneo del animal fue inmovilizado en un estereotáxico (Stoelting Company Wood Dale) para la posterior implantación de cánulas guía de acero inoxidable de 10 mm de longitud. Las coordenadas de canulación fueron: AP: -3.6, ML: +/- 3.0, DV: -1.3. El tiempo de recuperación post- operatorio fue de 10 días, luego de los cuales se dio inicio a los experimentos conductuales.

6.3 Administración farmacológica

La palmitoilación de proteínas es catalizado por una familia de enzimas palmitoil acil-transferasas (PAT), que comparten un dominio aspartato-histidina-histidina-cisteina (DHHC) conservado. El compuesto 2-bromopalmitato surge como un inhibidor general e inespecífico de las enzimas palmitoil acil-transferasa (Jennings *et al*, 2009).

Al entrar en la célula, el 2-bromopalmitato es convertido en 2-bromopalmitoil-CoA, aumentando su reactividad y afinidad por el dominio DHHC de las proteínas palmitoil-acil transferasa. Dado su unión covalente, mediante enlace tioéster, con el dominio DHHC, el 2-bromopalmitato se comporta como un inhibidor competitivo no reversible, bloqueando tanto la actividad acil-transferasa como la incorporación de nuevo palmitato en el sitio activo de la enzima (Davda *et al*, 2013).

La solución vehículo se preparó disolviendo DMSO (Sigma-Aldrich, No de producto 472301) al 5% en solución salina isotónica. El inhibidor 2-bromopalmitato se preparó diluyendo 0.1 g de ácido 2-bromohexadecanoico (Sigma-Aldrich, No. producto 238422) en 1 ml de DMSO (solución madre). De esta solución madre se tomaron 10 ul y se adicionaron 237.52 ul de DMSO (Solución Final). Al momento de cada experimento se tomaron 5 ul de la solución final, a los cuales se le adicionaron 95.33 ul de solución salina isotónica, obteniendo una solución de 600 uM de 2-bromopalmitato en DMSO 5%. Las soluciones fueron almacenadas a -20C°.

Los tratamientos farmacológicos consistieron en microinyecciones de 2-bromo palmitato (0.6 nmol, 2-Br) o DMSO 5% (vehículo) intrahipocampales a través de agujas dentales estériles de 30 G de 12 mm de longitud (Laboratorios Zizine) insertadas dentro de las cánulas guía, previamente implantadas en el cerebro de los animales. Cada aguja estaba conectada a una jeringa Hamilton de 10 ul, cuyo émbolo era impulsado por una bomba de inyección (Cole Parmer, serie 74900). Se inyectó un volumen de 1 ul en cada hemisferio a un flujo de 0.25 ul/min.

En el caso de la evaluación de los efectos de la inhibición sobre la palmitoilación sobre la adquisición, las inyecciones intrahipocampales se realizaron 30 minutos antes del inicio de las adquisiciones (figura 5). Para la evaluación de los efectos de inhibición de la palmitoilación en la consolidación, las inyecciones intrahipocampales se realizaron inmediatamente después de la adquisición (figura 5). Para la evaluación de los efectos de la inhibición de la palmitoilación sobre la evocación, se realizaron las inyecciones intrahipocampales 30 minutos antes del inicio de la prueba de memoria (figura 5).

6.4 Laberinto acuático de Morris

Este modelo conductual evalúa la capacidad de los animales de aprender y recordar la posición de una plataforma no visible en relación con claves espaciales que les permite localizar dicha plataforma y nadar hasta ella desde una posición de inicio en un laberinto acuático abierto (Vorhees & Williams, 2006)

El entrenamiento se realizó en un tanque Rotoplas circular con fondo y paredes negras, con una plataforma localizada en una posición fija por debajo del nivel del agua, de tal forma que no era visible para los animales. El tanque estaba rodeado por varias claves espaciales, hechas de figuras geométricas ubicadas en diferentes posiciones, fácilmente visibles para el animal. El entrenamiento (adquisición) consistió en 10 ensayos. En cada ensayo el animal fue introducido en el tanque en una de 10 posiciones aleatoriamente establecidas, permitiéndosele nadar por un máximo de 60 segundos para localizar la plataforma, donde permaneció por 30 segundos. Si el animal no localizaba la plataforma en el límite de tiempo establecido, se le conducía hacia ella. Después de los 30 segundos en la plataforma, el animal era retirado y descansaba por 30 segundos en una caja fuera del laberinto antes del siguiente ensayo. El experimentador se ubicó siempre en la misma posición de tal forma que servía como clave espacial adicional para el animal. Durante la fase de entrenamiento, se registró el tiempo requerido por el animal para llegar a la plataforma durante cada ensayo. Durante la fase de prueba, se registraron 3 parámetros.

-Tiempo de llegada a la plataforma: definido como el tiempo que requiere el animal desde el inicio del nado en la posición de inicio hasta el primer cruce que realiza el animal en el área donde se encontraba la plataforma durante la fase de entrenamiento.

-Tiempo en cuadrante objetivo y opuesto: Al dividirse el laberinto acuático de Morris en cuatro partes iguales, el cuadrante objetivo es aquel donde se encontraba la plataforma, mientras que el cuadrante opuesto es aquel que se localiza 180° con respecto a la línea que se forma entre el cuadrante objetivo y el centro del laberinto acuático de Morris.

-Número de cruces en la plataforma: Se define como el número de veces que el animal cruza el área en el que se encontraba la plataforma durante la fase de adquisición.

La prueba de memoria se realizó 24 horas después de la adquisición en el mismo laberinto, pero sin plataforma, donde se le permitió nadar a cada animal durante 60 segundos por una única vez, todos desde la misma posición de inicio. Se realizaron grabaciones de las pruebas para su posterior análisis.

6.5 Memoria de localización de objetos

Este paradigma evalúa la memoria espacial aprovechando la conducta exploratoria de los roedores, y a su tendencia de explorar por más tiempo los objetos novedosos (o en posición novedosa) que los objetos familiares. La evaluación se realiza en un laberinto de campo abierto al cual el animal ha sido previamente habituado, registrándose los tiempos de exploración para dos objetos (Vogel-Ciernia & Wood, 2014).

Se iniciaron las habituaciones de 5 minutos en el laberinto por 3 días, con previa desodorización de las cajas con etanol 70% y cambio de la cama de aserrín que recubre al laberinto. El día 4 se realizó la adquisición en el laberinto, que consistió en la exploración por 5 minutos de dos objetos ubicados en posiciones específicas. La prueba de memoria de corto plazo se realizó 90 minutos después de la sesión de adquisición, mientras que la prueba de memoria de largo plazo se realizó 24 horas después de la adquisición. Tanto la evaluación de la memoria de corto y de largo plazo consistieron en la exploración por 5 minutos de los mismos dos objetos, cambiando la posición relativa de uno de los objetos. Todas las exploraciones fueron grabadas y analizadas posteriormente.

6.6 Memoria de reconocimiento de objetos

Este modelo conductual aprovecha el comportamiento exploratorio de los roedores, y su capacidad de discriminación entre objetos novedosos y objetos explorados previamente. El tiempo empleado en la exploración de los objetos novedosos y familiares es un indicador de la capacidad de reconocer los objetos novedosos sobre los familiares (Vogel-Ciernia & Wood, 2014; Antunes & Biala, 2012).

Se utilizó el mismo procedimiento de habituaciones utilizado en la memoria de localización de objetos, permitiendo la exploración del laberinto por 5 minutos durante 3 días. La adquisición se realizó el día 4, con dos objetos idénticos ubicados en posiciones fijas, con un tiempo de exploración de 5 minutos. La prueba de memoria de largo plazo se realizó 24 horas después, en la cual uno de los objetos es cambiado por un objeto nuevo sin cambiar su ubicación relativa. Los animales exploraron los dos objetos por 5 minutos, luego de los cuales fueron retirados a su respectiva jaula. Todas las exploraciones fueron grabadas y analizadas posteriormente.

6.7 Histología

Luego de las evaluaciones conductuales, los animales fueron sacrificados y perfundidos con solución salina isotónica. Los cerebros fueron extraídos y se fijaron con paraformaldehído al 4% por al menos una semana. Dos días antes del procesamiento de los cerebros, se cambiaron los cerebros a sacarosa 30%. Se realizaron cortes de 40 μ m de ancho en el criostato (Leica CM1520) a 20C°. Los cortes se recuperaron y almacenaron en solución TBS. Los cortes de interés fueron montados en portaobjetos gelatinizados y se dejaron secando durante por 24 horas luego de los cuales se llevó a cabo la tinción de Nissl.

Por dos minutos, las muestras fueron sumergidas en agua destilada, seguido de inmersión en etanol 96% por dos minutos, inmersión en etanol 100% por dos minutos, y nuevamente en etanol al 96% por dos minutos, lavándola en agua destilada para quitar el etanol. La tinción se realizó con violeta de cresilo 0.1% por dos minutos, seguido de un lavado rápido en etanol 96%, y etanol al 100% hasta

secar. Una vez seco, se realizó una nueva inmersión en etanol/xilol en proporción 1:1 por un minuto y se aplicó resina sintética (Hycel, 7987-500) evitando que los tejidos se secaran.

6.8 Análisis estadístico

Para el laberinto acuático de Morris, durante la fase de entrenamiento, se registraron los tiempos de llegada a la plataforma durante cada ensayo. Para el día de la prueba de memoria, se registró el tiempo de llegada a la plataforma, los tiempos de permanencia en los cuadrantes objetivo y opuesto, la latencia al cuadrante objetivo, el número de cruces a la zona de la plataforma, y la velocidad de nado. Para observar las diferencias estadísticas entre los grupos, se realizó una prueba t de *student* con un valor de probabilidad menor a 0.05 ($p < 0.05$) como valor límite.

Para la memoria de localización de objetos y de reconocimiento de objetos, se registraron los tiempos de exploración de los objetos durante la fase de adquisición, y los tiempos de exploración de los objetos durante la evocación de la memoria. Estos tiempos de exploración fueron utilizados para obtener el índice de reconocimiento (IR) haciendo uso de la fórmula:

$$IR = \frac{Obj(X) \text{ ó } Obj(y)}{Obj(X) + obj(Y)}$$

Donde Obj (x) se refiere al tiempo de exploración del objeto familiar o tiempo de exploración del objeto en posición familiar, y Obj (y) hace referencia al tiempo de exploración del objeto novedoso o al tiempo de exploración del objeto en posición novedosa. Para observar las diferencias estadísticas entre los grupos, se realizó una prueba t de *student* con un valor de probabilidad menor a 0.05 ($p < 0.05$) como valor límite.

7. RESULTADOS

7.1 Determinación del sitio de inyección del fármaco

Para confirmar que la inyección del fármaco fue en la región de CA1 del hipocampo, se realizó la determinación histológica. Después de las pruebas conductuales, se determinó el sitio de canulación en el hipocampo dorsal con coordenadas: AP: -3.6; ML: +/- 3.0; DV: -1.3, mientras que el sitio de inyección se encontró 2 mm por debajo del sitio de canulación, con coordenadas: AP: -3.6; ML: +/- 3.0; DV: -3.3 (figura 6).

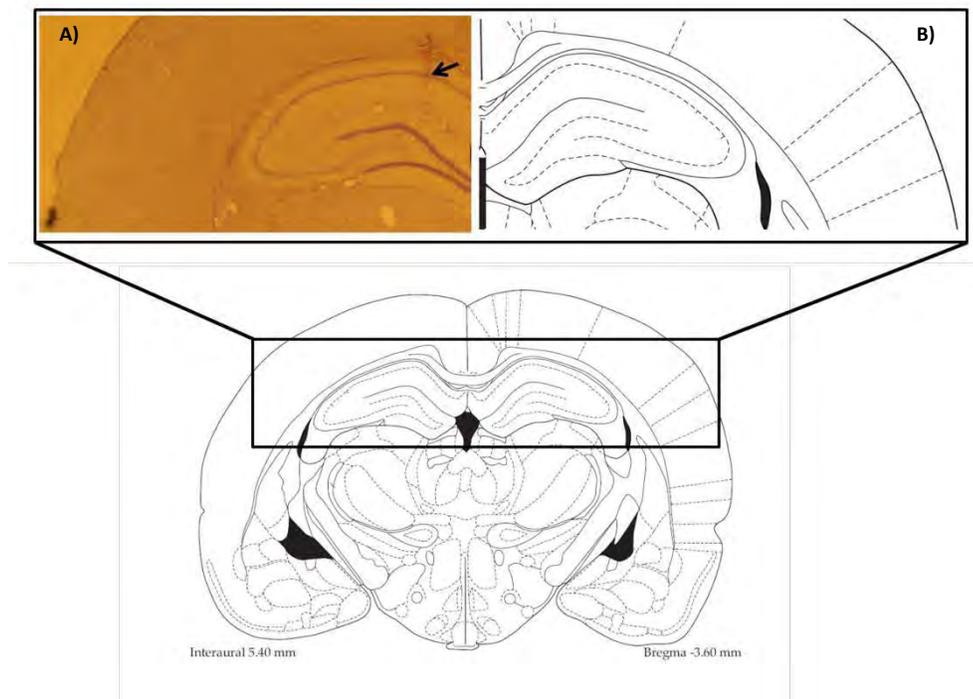


Figura 6. Corte histológico del sitio de canulación. A) Mediante la técnica de Nissl que marca el citoplasma de las células nerviosas, se observó la región CA1 del hipocampo dorsal en rata. La flecha negra indica la trayectoria del inyector. B) Diagrama representativo del corte coronal a la coordenada anteroposterior correspondiente a bregma -3.60 mm (Paxinos & Watson, 1996).

7.2 Inhibición de la palmitoilación en la adquisición

La inhibición de la palmitoilación no permite el aprendizaje en el laberinto acuático de Morris. Treinta minutos antes del inicio de la fase de adquisición en la tarea del laberinto acuático de Morris, los animales fueron inyectados con el inhibidor de la palmitoilación o el vehículo (figura 7A). Las curvas de aprendizaje permiten observar un menor tiempo de llegada a la plataforma en los grupos tratados con vehículo comparado con los animales tratados con el inhibidor de palmitoilación (figura 7B), acentuándose principalmente en los últimos ensayos de adquisición (ensayo 8, $p=0.015$; ensayo 9, $p=0.026$, ensayo 10 $p=0.011$). Mientras que los animales del grupo vehículo presentan un menor tiempo de llegada a la plataforma en el último ensayo comparado con el primer ensayo ($p=1.37 \times 10^{-7}$). Los animales tratados con el inhibidor de palmitoilación no presentaron una mejor ejecución de la tarea en el laberinto acuático de Morris, viéndose reflejado en la prueba de memoria de largo plazo realizado 24 horas después del entrenamiento, principalmente en la latencia de llegada a la plataforma (figura 7C) en donde los animales tratados con vehículo presentan una menor latencia de llegada a la plataforma (promedio: 27.10 segundos), mientras que los animales tratados con el inhibidor de palmitoilación tienen un mayor tiempo de latencia (promedio: 59.53 segundos) ($p=0.013$). El número de cruces a la plataforma (figura 7C) aumentó en los animales vehículo comparado con los animales tratados con el inhibidor de palmitoilación ($p=0.043$), mientras que no se observan diferencias en el tiempo de permanencia en los cuadrantes objetivos comparado con el cuadrante opuesto en los animales control, pero si en los animales tratados con inhibidor de palmitoilación, siendo mayor el tiempo de permanencia en el cuadrante opuesto (figura 7C). Por lo tanto, la inhibición de la palmitoilación antes de la adquisición impide el aprendizaje y como consecuencia de esto la consolidación no ocurre.

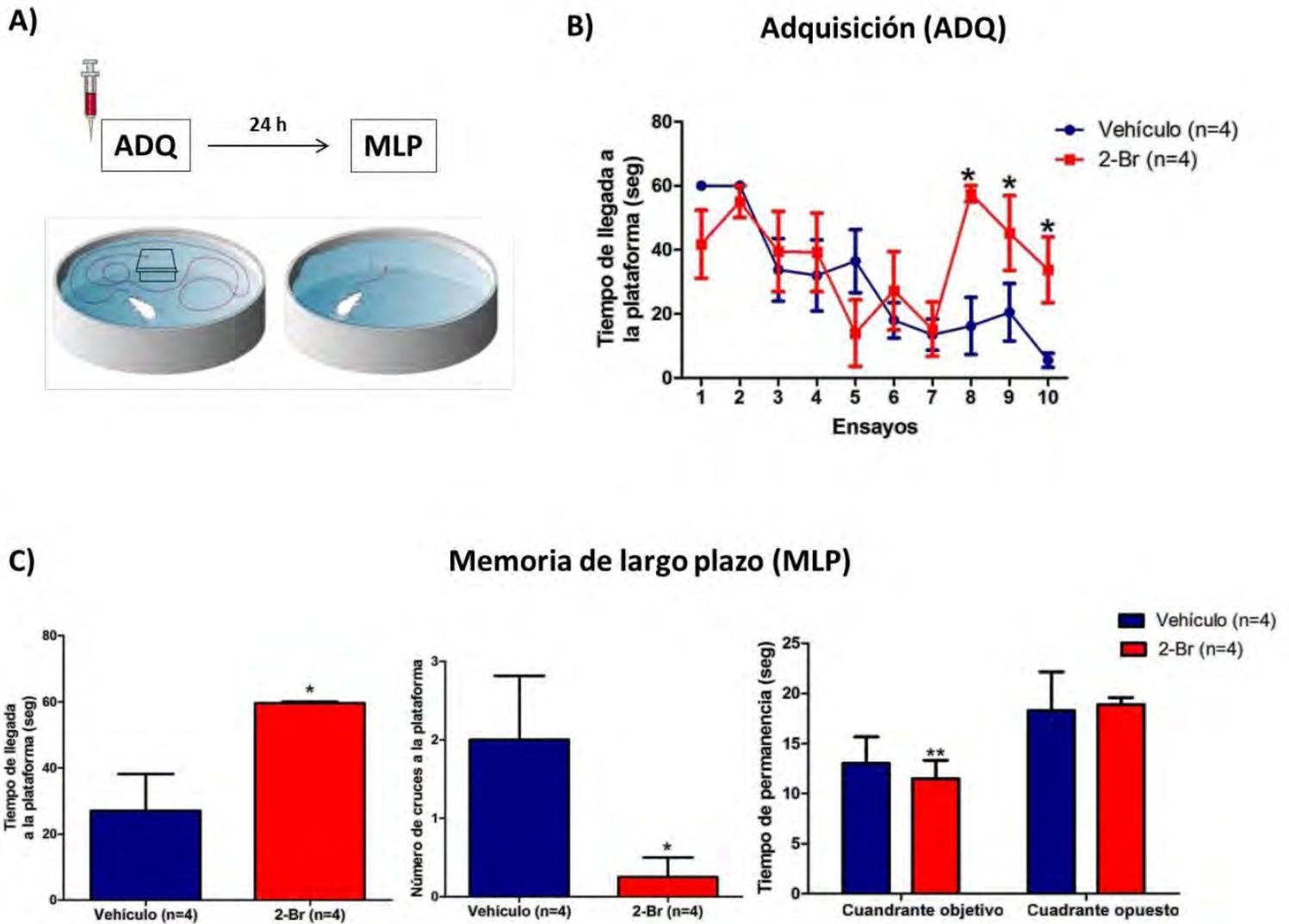


Figura 7. La inhibición de la palmitoilación no permite el aprendizaje en el laberinto acuático de Morris. A) Diseño experimental para la administración farmacológica de DMSO 5% (vehículo) o 2-bromopalmitato (2-Br). B) Curva de aprendizaje de los grupos de animales tratados con vehículo (azul) y el inhibidor 2-bromopalmitato (rojo) durante el entrenamiento con la plataforma sumergida. C) 24 h después se realizó la prueba de memoria de largo plazo, sin la plataforma. Se evaluó el tiempo de llegada a la plataforma, el número de cruces a la plataforma y el tiempo de permanencia en los cuadrantes objetivo y opuesto. Las determinaciones son el promedio \pm EEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

La inhibición de la palmitoilación no afecta la adquisición, pero afecta la consolidación de la memoria de localización de objetos. Treinta minutos antes del inicio de la fase de adquisición del paradigma de localización de objetos, los animales fueron inyectados con el inhibidor de la palmitoilación o el vehículo (figura 8A). Durante las adquisiciones el índice de reconocimiento de objetos de ambos grupos es el mismo entre los dos objetos, lo cual indica que no hay preferencia por ninguno de los objetos (figura 8B). Para saber si la inhibición afectó la adquisición del paradigma, se realizó la prueba de memoria de corto plazo 90 minutos después de la adquisición (figura 8C). Al cambiarse uno de los objetos a una posición nueva los animales de ambos grupos tuvieron mayores índices de reconocimiento del objeto en posición novedosa comparado con el objeto en posición familiar (vehículo $p=0.003$; inhibidor de palmitoilación $p=2.43 \times 10^{-8}$), lo cual indica que la adquisición no fue afectada. Sin embargo, al evaluarse la memoria de largo plazo, se observó que la inhibición de la palmitoilación no permitió que los animales 2-Br discriminaran el objeto en posición novedosa del objeto en posición familiar, mientras que los animales inyectados con vehículo presentaron un mayor índice de reconocimiento del objeto en posición novedosa sobre el objeto en posición familiar ($p=0.00012$) (figura 8B). Por lo tanto, la inhibición de la palmitoilación afectó únicamente la consolidación de la memoria de localización de objetos.

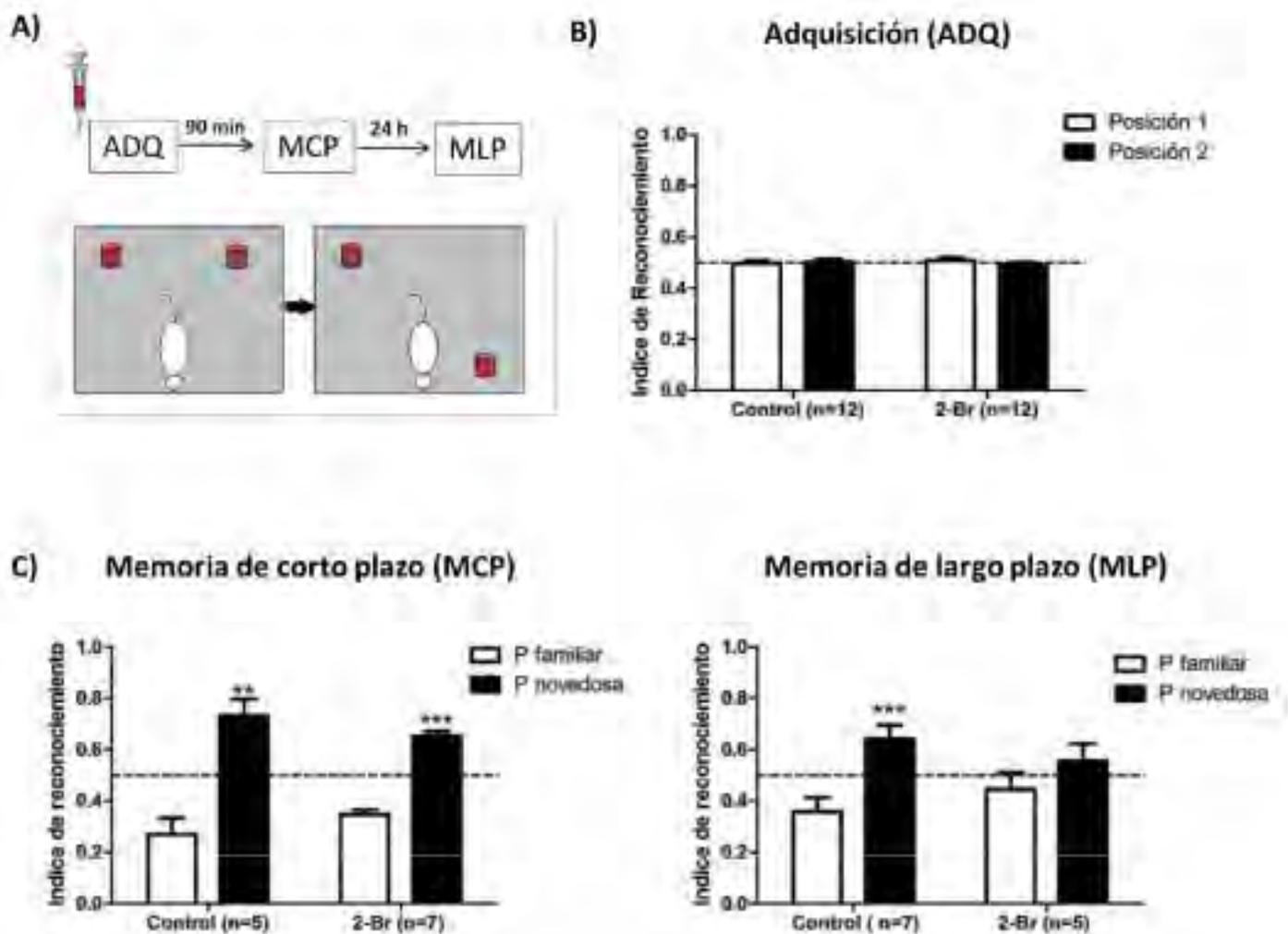


Figura 8. La inhibición de la palmitoilación no afecta la adquisición, pero afecta la consolidación de la memoria de localización de objetos. A) Diseño experimental para la administración farmacológica de DMSO 5% (vehículo) o 2-bromopalmitato (2-Br). B) Fase de adquisición donde se presentaron dos objetos idénticos en posiciones específicas. C) 90 min después se evaluó la memoria de corto plazo y 24 h después la prueba de memoria largo plazo. Durante la prueba, uno de los objetos cambio de posición. Las determinaciones son el promedio \pm EEM. **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

7.3 Inhibición de la palmitoilación en la consolidación

La inhibición de la palmitoilación no permite la consolidación de la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris. Los animales fueron inyectados con el inhibidor de palmitoilación o el vehículo inmediatamente después de la adquisición (figura 9A). La prueba de memoria de largo plazo se realizó 24 horas después. Los animales aprendieron la posición de la plataforma durante la fase de entrenamiento que se ve reflejado en un menor tiempo de llegada a la plataforma en el último ensayo comparado con el primer ensayo durante la fase de adquisición ($p=0.02$) (figura 9B). Durante la prueba de memoria de largo plazo el grupo tratado con el vehículo presentó un mayor tiempo de nado en el cuadrante objetivo comparado con el cuadrante opuesto (figura 9C), mientras que los animales tratados con el inhibidor de palmitoilación no presentaron diferencias en los tiempos de permanencia en los dos cuadrantes, lo que refleja que no retuvieron la información referente a la ubicación de la plataforma. El número de cruces a la plataforma (figura 9C) fue mayor en los animales vehículo comparado con los animales 2-Br, pero el tiempo de llegada a la plataforma no presentó diferencia entre ambos grupos (figura 9C). Sin embargo, los animales inyectados con vehículo presentaron una tendencia a ejecutar mejor la tarea comparados con los animales tratados con el inhibidor de palmitoilación. Por lo tanto, la inhibición de la palmitoilación afecta la consolidación de la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris.

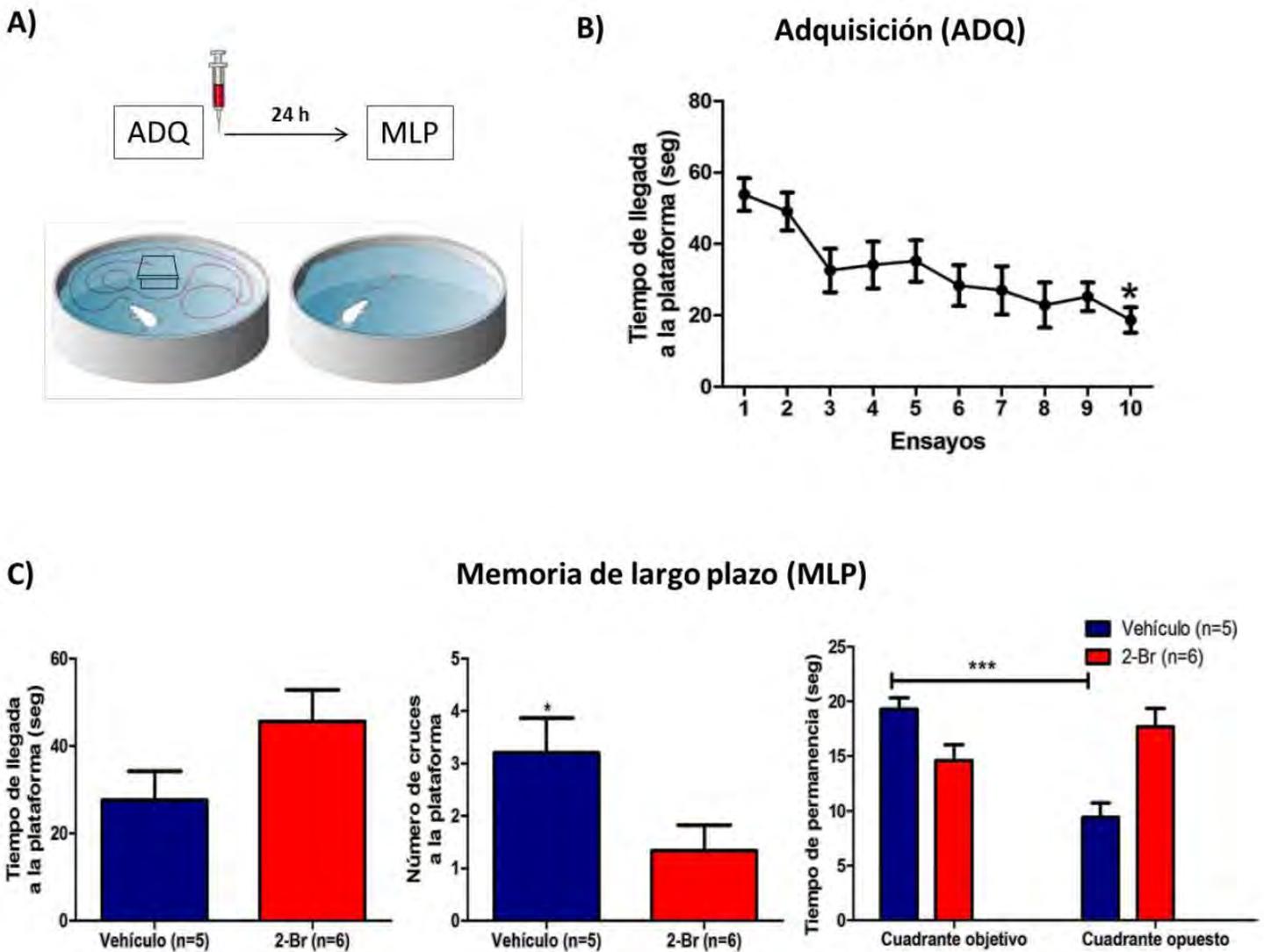


Figura 9. La inhibición de la palmitoilación no permite la consolidación de la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris. A) Diseño experimental para la administración farmacológica de DMSO 5% (vehículo) o 2-bromopalmitato (2-Br). B) Curva de aprendizaje de los animales antes de la administración farmacológica con la plataforma sumergida, después del entrenamiento los animales fueron divididos en dos grupos para ser administrados con vehículo o 2-Br. C) 24 h después se realizó la prueba de memoria de largo plazo, sin la plataforma. Se evaluó el tiempo de llegada a la plataforma, el número de cruces a la plataforma y el tiempo de permanencia en los cuadrantes objetivo y opuesto. Las determinaciones son el promedio \pm EEM. * $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$.

La inhibición de la palmitoilación no permite la consolidación de la memoria de localización de objetos. Las inyecciones de la solución vehículo o 2-bromopalmitato se llevaron a cabo inmediatamente después de la adquisición (figura 10A). Dado la novedad de los objetos, los animales de ambos grupos exploraron ambos objetos de forma equitativa (figura 10B), sin preferencia por uno de los dos objetos. La prueba de memoria de largo plazo se realizó 24 horas después de la adquisición. Los animales del grupo vehículo presentaron una clara preferencia exploratoria por el objeto en la nueva posición (promedio=0.68) comparado con el objeto en la posición familiar (promedio=0.32) ($p=3.21 \times 10^{-7}$). Sin embargo, los animales tratados con 2-Br-palmitato exploraron el mismo tiempo ambos objetos (figura 10C). Por lo tanto, la inhibición de la palmitoilación afecta la consolidación y como consecuencia, los animales no evocan la memoria de localización de objetos.

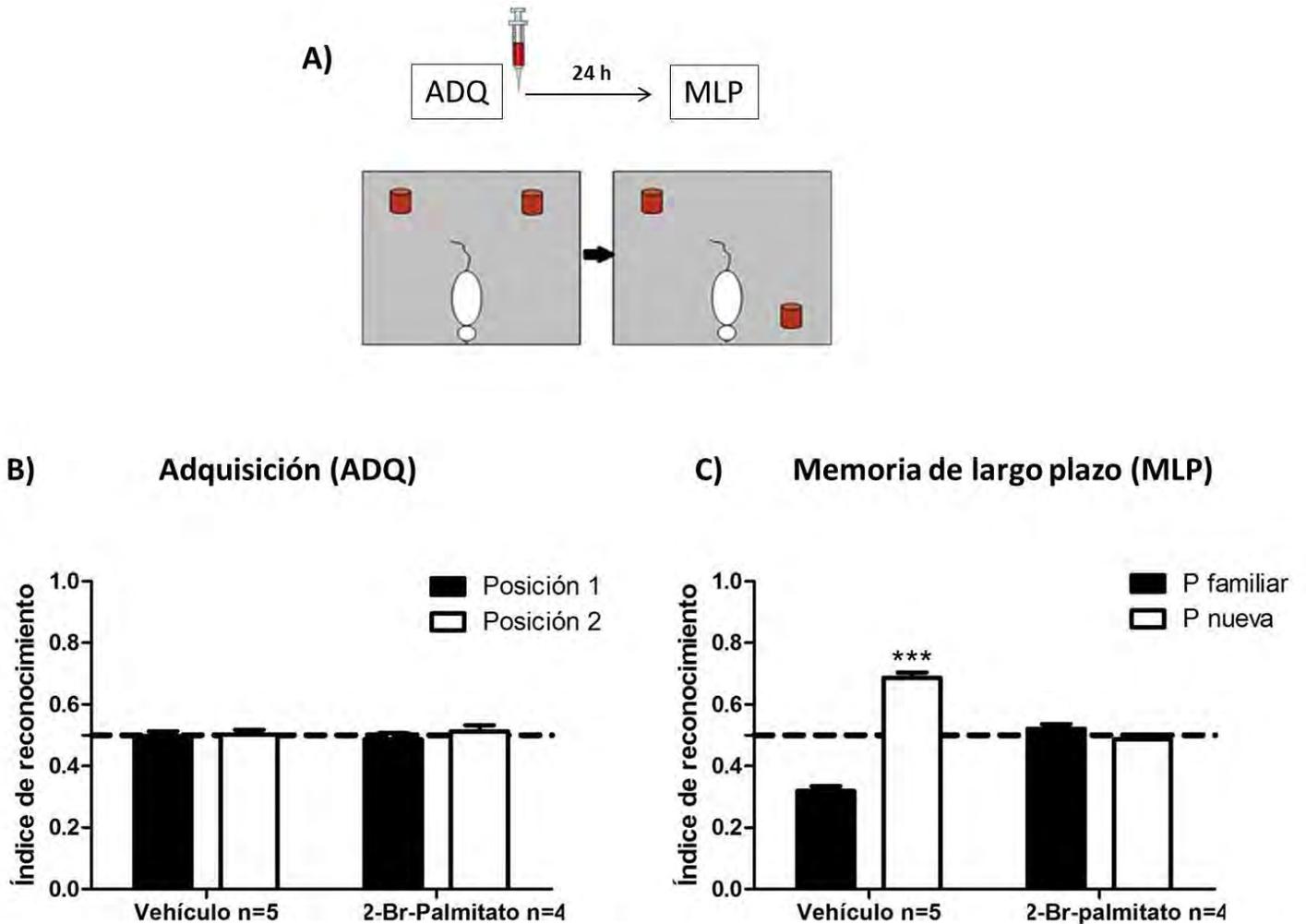


Figura 10. La inhibición de la palmitoilación no permite la consolidación de la memoria de localización de objetos. A) Diseño experimental para la administración farmacológica de DMSO 5% (vehículo) o 2-bromopalmitato (2-Br). B) Fase de adquisición donde se presentaron dos objetos idénticos en posiciones específicas. C) 24 h después se realizó la prueba de memoria largo plazo donde uno de los objetos cambio de posición. Las determinaciones son el promedio \pm EEM. ***: $p < 0.001$.

La inhibición de la palmitoilación en el hipocampo dorsal no afecta la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos. Con el fin de saber si la inhibición de la palmitoilación en el hipocampo afectaba únicamente las tareas conductuales dependientes de esta estructura, realizamos una tarea de reconocimiento de objetos independiente del hipocampo. Las inyecciones en las ratas tratadas con el inhibidor de palmitoilación o vehículo se realizaron inmediatamente después de la adquisición de la tarea (figura 11A). Los animales no presentaron preferencia de exploración por ninguno de los dos objetos durante la adquisición (vehículo: $p=0.27$; inhibidor: $p=0.48$) (figura 11B). Al realizarse la sesión de prueba de memoria de largo plazo, se observó que tanto el grupo de animales vehículo ($p=0.0002$) como el grupo tratado con 2-bromopalmitato (0.0009) discriminaron los objetos novedoso y familiar, reflejado en un mayor índice de reconocimiento para el objeto novedoso (figura 11C). Por lo tanto, la inhibición de la palmitoilación en el hipocampo dorsal no tiene efecto en la consolidación de una tarea independiente de esta estructura.

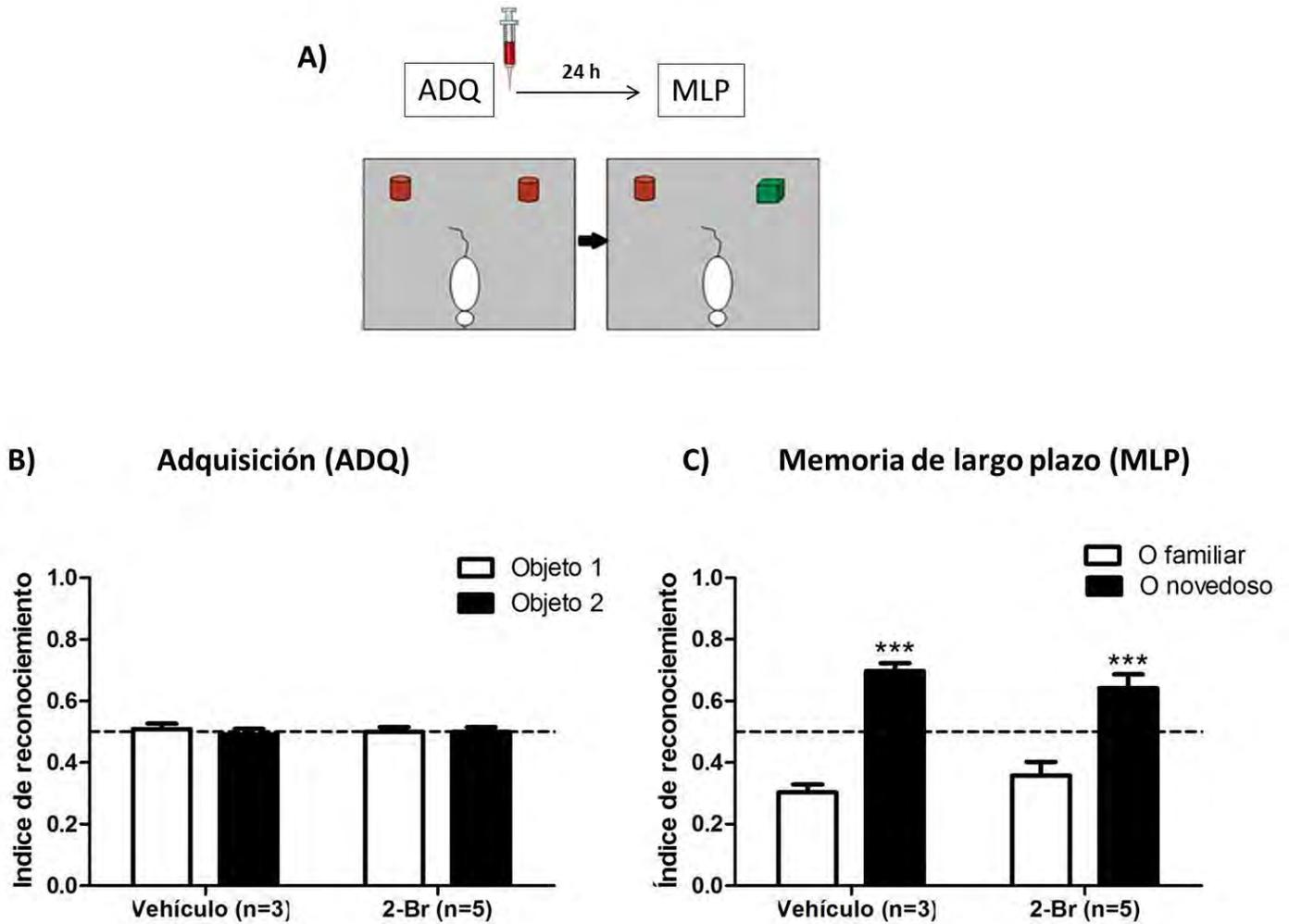


Figura 11. La inhibición de la palmitoilación en el hipocampo dorsal no afecta la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos. A) Diseño experimental para la administración farmacológica de DMSO 5% (vehículo) o 2-bromopalmitato (2-Br). B) Fase de adquisición donde se presentaron dos objetos idénticos. C) 24 h después se realizó la prueba de memoria largo plazo donde uno de los objetos familiares fue cambiado por un objeto nuevo. Las determinaciones son el promedio \pm EEM. ***: $p < 0.001$.

7.4 Inhibición de la palmitoilación en la evocación

La inhibición de la palmitoilación no afecta la evocación de la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris. Dado que las inyecciones de inhibidor de la palmitoilación o el vehículo se realizaron después del entrenamiento (figura 12A), durante la fase de entrenamiento los animales se consideraron en un solo grupo (figura 12B), y se observó menor tiempo de llegada a la plataforma a partir del quinto ensayo, siendo diferente el último ensayo con el primer ensayo ($p=0.004$). La inyección de 2-Bromopalmitato 15 min antes de la prueba de memoria de largo plazo no afectó la evocación de la memoria comparado con el grupo vehículo, lo cual se ve reflejado en el tiempo de permanencia en los cuadrantes opuesto y objetivo (vehículo: $p=0.02$; inhibidor: $p=0.002$) (figura 12C). De igual manera, al cuantificar el número de cruces a la plataforma, ambos grupos presentaron un comportamiento similar (vehículo: promedio 2.83 cruces; inhibidor: promedio 3.61 cruces; $p=0.39$) (figura 12C), al igual que en el tiempo de llegada a la plataforma en el día de la prueba (vehículo: promedio: 27.44 segundos, inhibidor: 20.51 segundos; $p=0.26$) (figura 12C). Por lo tanto, los animales recordaron donde se encontraba la plataforma el día de la prueba de memoria de largo plazo, lo cual significa que la inhibición de la palmitoilación no afecta la evocación de la memoria.

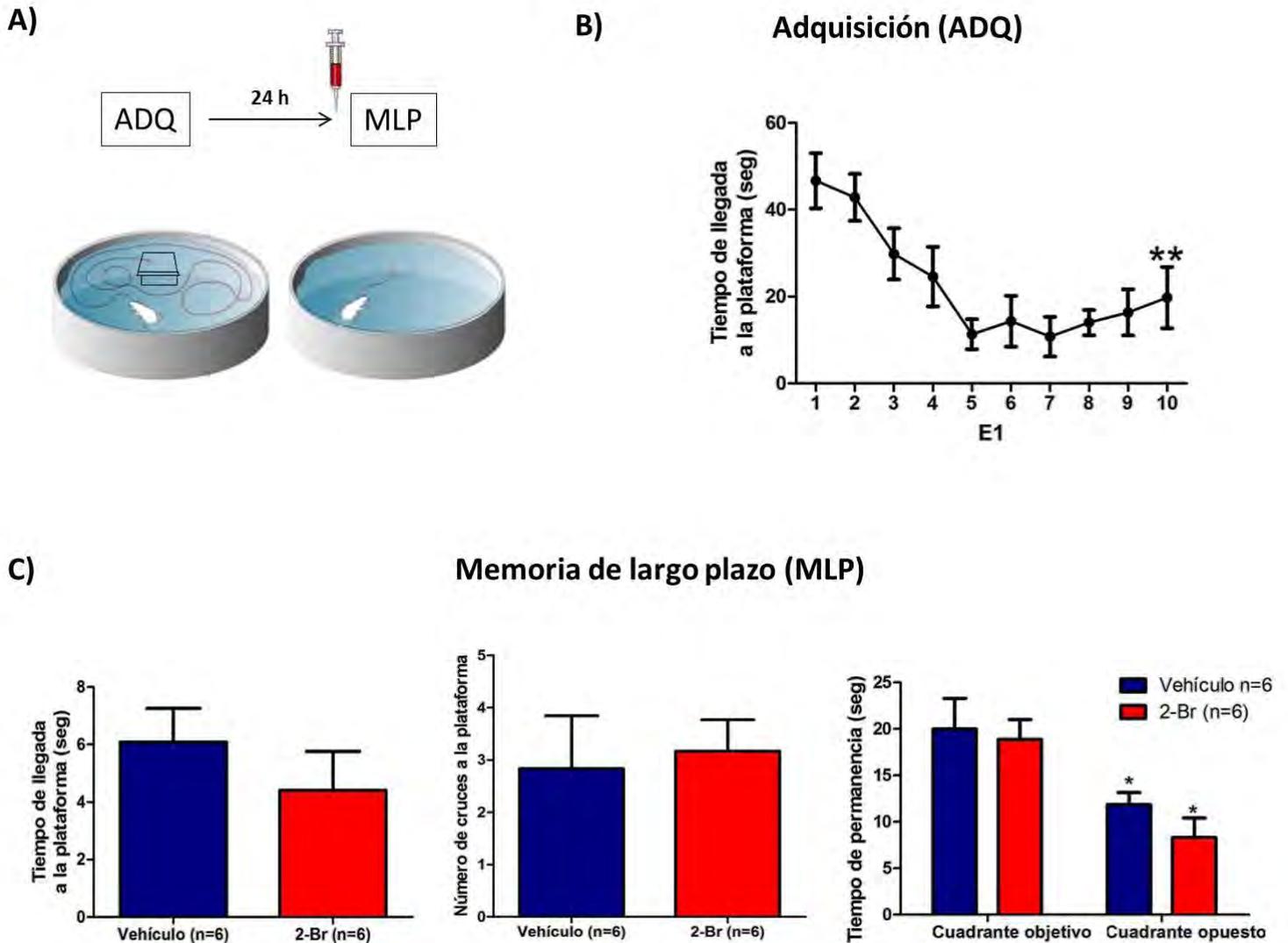


Figura 12. La inhibición de la palmitoilación no afecta la evocación de la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris. A) Diseño experimental para la administración farmacológica de DMSO 5% (vehículo) o 2-bromopalmitato (2-Br). B) Curva de aprendizaje de los animales antes de la administración farmacológica con la plataforma sumergida, después del entrenamiento los animales fueron divididos en dos grupos para ser administrados con vehículo o 2-Br. C) 24 h después se realizó la prueba de memoria de largo plazo, sin la plataforma. Se evaluó el tiempo de llegada a la plataforma, el número de cruces a la plataforma y el tiempo de permanencia en los cuadrantes objetivo y opuesto. Las determinaciones son el promedio \pm EEM. * $p < 0.05$.

La evocación de la memoria de localización de objetos no se ve afectada por la inhibición de la palmitoilación. Las inyecciones en las ratas tratadas con el inhibidor de palmitoilación o vehículo se realizaron 30 minutos antes de la prueba de memoria (figura 13A). Cumpliendo con los criterios de exclusión durante la adquisición, los animales no presentaron preferencias de exploración por alguno de los dos objetos debido a la novedad por ambos objetos a explorar (figura 13B). Siguiendo el protocolo de memoria de localización de objetos, el grupo vehículo reconoció el objeto nuevo siendo su índice de reconocimiento significativamente mayor al objeto familiar ($p=0.01$). El grupo de animales tratados con 2-bromopalmitato, exploró de forma significativamente mayor al objeto en posición novedosa comparado con el objeto en posición familiar ($p=0.04$) (figura 13C). Por lo tanto, la inhibición de la palmitoilación no tiene efecto durante la evocación de la memoria de localización de objetos.

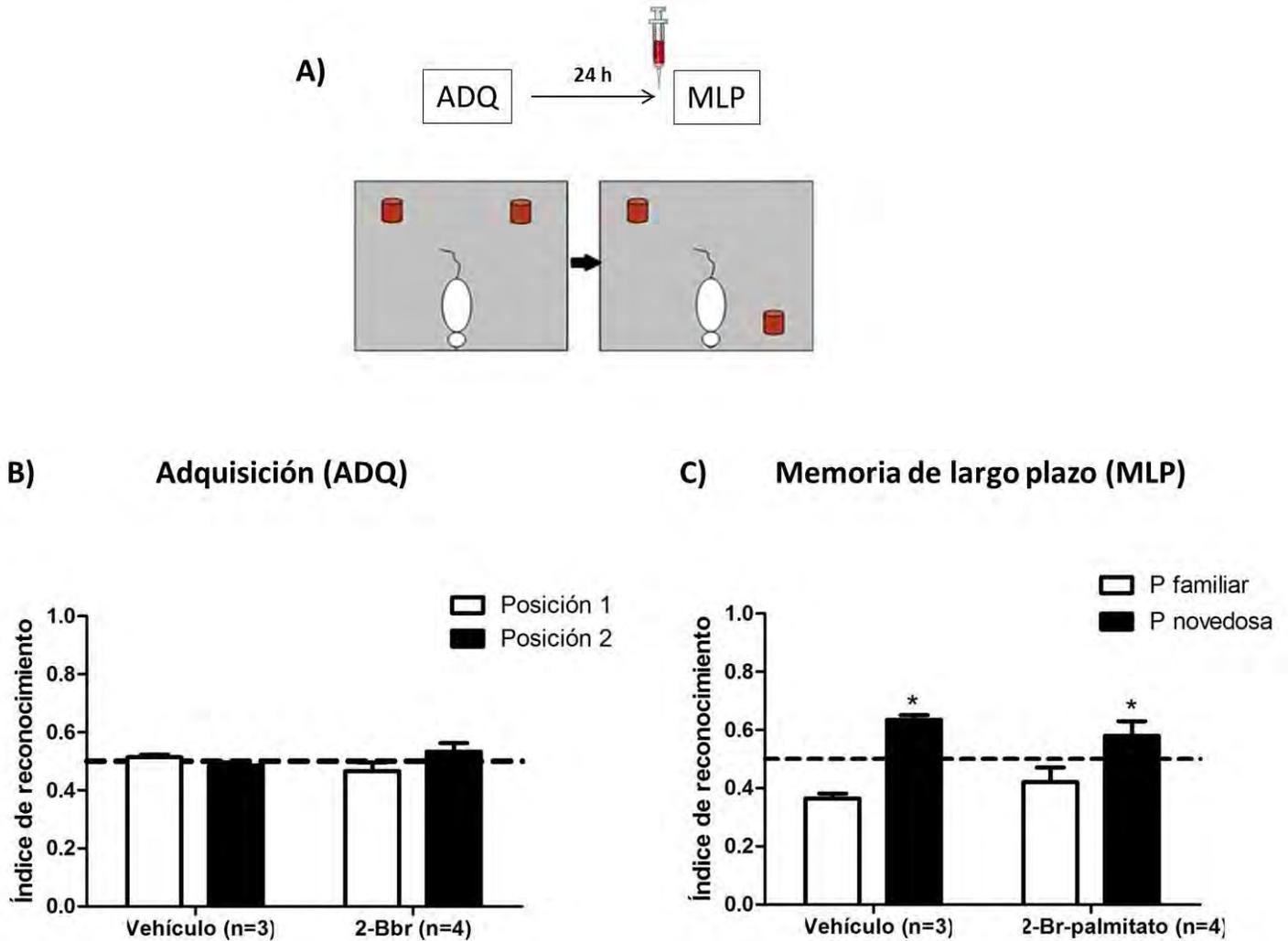


Figura13. La evocación de la memoria de localización de objetos no se ve afectada por la inhibición de la palmitoilación. A) Diseño experimental para la administración farmacológica de DMSO 5% (vehículo) o 2-bromopalmitato (2-Br). B) Fase de adquisición donde se presentaron dos objetos idénticos en posiciones específicas. C) 24 h después se realizó la prueba de memoria largo plazo donde uno de los objetos cambio de posición. Las determinaciones son el promedio \pm EEM. *:p<0.05.

8. DISCUSIÓN

El aprendizaje y la memoria es la capacidad que tiene un organismo para adquirir, codificar, almacenar y recuperar información (Kandel & Pittenger, 1990; Sunyer *et al*, 2008; Carrillo-Mora *et al*, 2009). Los estímulos externos que recibe el organismo pueden provocar que algunas conexiones sinápticas se potencien, mientras que otras se debiliten (Villareal *et al*, 2002; Ge *et al*, 2010). Este proceso de plasticidad sináptica resulta esencial para el aprendizaje y la memoria. Se ha reportado que la plasticidad sináptica esta mediada por diferentes mecanismos como la potenciación de largo plazo (LTP) y la depresión de largo plazo (LTD), la eficacia sináptica en términos de cambios en la expresión de receptores y liberación de neurotransmisores (Schulz, 1997; Ehrlich & Malinow, 2004; Moulton *et al*, 2006; Sanderson *et al*, 2011; Atwood *et al*, 2014), la transducción de señales, cambios en la expresión génica y la síntesis de nuevas proteínas (Abel & Lattal, 2001; Sutton & Schuman, 2006). También se sabe que la palmitoilación regula el tráfico vesicular y la localización de proteínas relevantes en procesos de plasticidad sináptica. A pesar de que se han descrito parcialmente, los mecanismos celulares implicados en la plasticidad sináptica que permiten la entrada y el establecimiento de la información al sistema para crear una memoria no han sido completamente entendidos.

Debido a esto y dado que estudiar la fisiología celular detallada de cualquier sistema vivo sin evaluar su comportamiento o viceversa no puede dar suficiente información para entender la función integral del sistema, en este trabajo evaluamos la participación de la palmitoilación en la formación y el mantenimiento de la memoria espacial. Nuestros resultados indican que la palmitoilación de proteínas mediada por las enzimas palmitoil acil-transferasas está implicada en la adquisición y consolidación, pero no en la evocación de la memoria espacial. Se observó que la inhibición de la palmitoilación impide el aprendizaje en el laberinto acuático de Morris, pero no afecta el aprendizaje en el paradigma de localización de objetos. Puesto que la palmitoilación de proteínas favorece los procesos de plasticidad sináptica, al ser inhibida, se interfieren los mecanismos celulares y moleculares relacionados con la adquisición de la información espacial.

La localización de proteínas en balsas lipídicas y el tráfico vesicular desde el aparato de Golgi hacia la membrana celular, son regulados por palmitoilación, siendo importantes para la inducción de la plasticidad sináptica (Hering et al, 2003; Golub et al, 2004; Conibear & Davis, 2010; Anggono & Huganir, 2012). De hecho, se ha reportado que como consecuencia del entrenamiento en el laberinto acuático de Morris ocurre un aumento de las subunidades NR1, NR2A, NR2B del receptor NMDA y la proteína de ensamblaje PSD-95 en los dominios de balsas lipídicas con una disminución de las mismas proteínas en las regiones de densidad postsináptica (Delint et al, 2008). Esto favorece la correcta interacción entre las proteínas y la regulación de la función de los receptores mediada por PSD-95 (Li et al, 2010; Zhang et al, 2011; Yokoi et al, 2016) que activan cascadas de señalización que promueven los eventos relacionados con la plasticidad sináptica y la formación de la memoria, por lo que la inhibición de la palmitoilación modifica los procesos dependientes de este mecanismo. De manera contradictoria, en el paradigma de localización de objetos no se afecta la fase adquisición. Es posible que este resultado sea causado debido que, de acuerdo con estudios previos, no es clara la participación del hipocampo en la fase de adquisición de la memoria de reconocimiento, pero si es clara su participación en la consolidación de esta memoria (Rossato et al, 2007; Barker & Warburton, 2011). Nuestros resultados apoyan estos reportes, dado que la inhibición de la palmitoilación durante la fase de consolidación no permitió el establecimiento de la memoria de localización de objetos y el laberinto acuático de Morris. Esto sugiere que la palmitoilación está implicada en los mecanismos celulares que permiten las síntesis de proteínas necesarias para la consolidación de la memoria. Al evaluarse los efectos de la inhibición de la palmitoilación sobre la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos, un modelo de memoria independiente de hipocampo (Balderas et al 2008; Assini et al, 2009; Bark & Walbiurton, 2011), se reportó que los animales lograron discriminar el objeto novedoso sobre el objeto familiar, por lo que, los efectos de la inhibición de palmitoilación en los procesos de plasticidad neuronal son específicos del hipocampo. En concordancia con estos resultados, al bloquearse la actividad de los receptores NMDA (Yamada et al, 2017) o la inhibición de la síntesis de proteínas con anisomicina (Balderas et al, 2008) en el hipocampo,

no se afecta la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos. Por lo tanto, nuestra aproximación farmacológica refuerza la hipótesis de la participación del hipocampo en la consolidación de la memoria de localización de objetos, pero no en la memoria de reconocimiento de objetos. Por último, encontramos que la palmitoilación de proteínas no es necesaria para la evocación de la memoria espacial en los dos paradigmas conductuales que evaluamos. Se ha descrito que inmediatamente de después de la adquisición, durante un periodo de tiempo que puede ser de minutos e incluso horas, se activan diferentes mecanismos que favorecen la síntesis proteica permitiendo el remodelamiento de las sinapsis y como consecuencia el establecimiento de la memoria (Berkinschtein *et al*, 2007; Balderas *et al*, 2008, Rossato *et al*, 2007). Debido que la inhibición de la palmitoilación se realizó 24 h después que los animales adquirieron la información, es posible que dicho proceso ya hubiese ocurrido. Una vez estabilizado el trazo de la memoria, los mecanismos regulados por palmitoilación no son necesarios para la expresión conductual de la memoria previamente ocurrida. En conclusión, nuestros resultados indican que la palmitoilación es un proceso importante en la regulación de los mecanismos celulares y moleculares asociados a la formación de la memoria, por lo que resulta relevante profundizar en el estudio de estos mecanismos.

9. CONCLUSIONES

- La inhibición de la palmitoilación en el hipocampo durante la fase de entrenamiento en el laberinto acuático de Morris impide la adquisición de la información.
- La inhibición de la palmitoilación en el hipocampo no afecta la adquisición de la memoria de localización de objetos.
- La inhibición de la palmitoilación en el hipocampo impide la consolidación de la memoria espacial en los dos modelos conductuales evaluados.
- La inhibición de la palmitoilación en el hipocampo no afecta la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos.
- La inhibición de la palmitoilación en el hipocampo no afecta la evocación de la memoria espacial en los dos modelos conductuales evaluados.

10. BIBLIOGRAFIA

Abel T, Lattal k. (2001). Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr Opin Neurobiol.* 11: 180-187.

Aggleton J, Brown M. (1999). Episodic Memory, amnesia and the hippocampal-anterior thalamic axis. *Behav Brain Sci.* 22:425-489.

Anggono V, Huganir R. (2012). Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol.* 22:461-469.

Assini F, Duzzioni M, Takahashi R. (2009) Object location memory in mice: Pharmacological validation and further evidence of hippocampal CA1 participation. *Behav. Brain Res.* 204: 206-211.

Atwood B, Lovinger D, Mathur B. (2014). Presynaptic long-term depression mediated by $G_{i/o}$ -coupled receptors. *Trends in Neuroscience.* 37:663-673.

Balderas I, Rodriguez-Ortiz C, Salgado-Tonda P, Chavez-Hurtado J, McGaugh J, Bermudez-Rattoni F. (2008). The consolidation of object and context recognition memory involve different regions of temporal lobe. *Learn Mem.* 15: 618-624.

Barco A, Bailey C, Kandel E. (2006). Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory. *J Neurochem.* 97: 1520-1533.

Ben Mamou C, Gamache K, Nader K. (2006). NMDA receptor are critical for unleashing consolidated auditory fear memories. *Nat Neurosci.* 9: 1237-1239.

Berkinschtein P, Cammarota M, Igaz L, Bevilaqua L, Izquierdo I, Medina J. (2007). Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. *Cell.* 53:261-277.

Bhattacharyya R, Barren C, Kovacs D. (2013). Palmitoylation of amyloid precursor protein regulates amyloidogenic processing in lipid rafts. *Journal of Neuroscience.* 33:11169-11183.

Bijlmakers M, Marsh M. (2003). The on-off story of protein palmitoylation. *Trends in Cell Biology.* 13:32-42.

Bohbot V, Iaria G, Petrides M. (2004). Hippocampal function and spatial memory: evidence from functional neuroimaging in healthy participants and performance of patients with medial temporal lobe resection. *Neuropsychology.* 18:418-425.

Borges K, Dingledine R. (1998). AMPA receptors: molecular and functional diversity. *Prog Brain Res.* 116:153-170.

Brigidi G, Sun Y, Beccano-Kelly D, Pitman K, Mobasser M, Borgland S, Milnerwood A, Bamji S. (2014). Palmitoylation of δ -catenin by DHHC5 mediates activity-induced synapse plasticity. *Nat Neurosci.* 17:522-532.

Burwell R, Amaral D. (1998). Cortical afferents of the perirhinal, postrhinal and entorhinal cortices of rats. *J Comp Neurol.* 398: 179-205.

Bussey T, Duck J, Muir J, Aggleton J. (2000). Distinct patterns of behavioural impairments resulting from fornix transection or neurotoxic lesions of the perirhinal and postrhinal cortices in the rat. *Behav Brain Res.* 61: 123-131.

Camp L, Hofmann S. (1993). Purification and properties of a palmitoyl protein thioesterase that cleaves palmitate from H-Ras. *J. Biol. Chem.* 268:22566-22574.

Clem R, Barth A. (2006). Pathway-specific trafficking of native AMPARs by in vivo experience. *Neuron.* 49:725-737.

Conibear E, Davis N. (2010). Palmitoylation and depalmitoylation dynamics at the glance. *Journal of cell Science.* 123:4007-4010.

Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M. (2001). NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol.* 11:327-335.

Davda D, El-Azzouny M, Tom C, Hernandez J, Majmudar J, Kennedy R, Martin B. (2013). Profiling targets of the irreversible palmitoylation inhibitor 2-bromopalmitate. *ACS Chem Biol.* 8:1912-1917.

Delint-Ramirez I, Salcedo-Tello P, Bermudez, F (2008). Spatial memory formation induces recruitment of NMDA receptor and PSD-95 to synaptic lipid rafts. *J Neurochem.* 106: 1658-1668.

Delint-Ramirez I, Willoughby D, Hammond G, Ayling L, Cooper D. (2015). Palmitoylation targets AKAP79 protein to lipid rafts and promotes its regulation of calcium-sensitive adenylyl cyclase type 8. *J. Biol Chem.* 286:32962-32975.

Dudai Y. (2002). Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Curr Opin Neurobiol.* 12: 211-216.

El-Husseini A, Schnell E, Dakoji S, Sweeney N, Zhou Q, Prange O, Gauthier-Campbell C, Aguilera-Moreno A, Nicoll R, Bredt D. (2002). Synaptic strength regulated by palmitate cycling on PSD95. *Cell.* 108:849-863.

Ehrlich I, Malinow R. (2004). Postsynaptic density 95 controls AMPA receptors incorporation during long-term potentiation and experience-driven synaptic plasticity. *J Neurosci.* 24: 916-927.

Ferretti V, Roullete P, Sargolini F, Rinaldi A, Perri V, del Fabbro M, Constantini V, Annese V, Scesa G, De Stefano M, Oliverio A, Mele A. (2010). Ventral Striatal plasticity and spatial memory. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 17: 7945-7950.

Ferraguti F, Shigemoto R. (2006). Metabotropic glutamate receptors. *Cell and Tissue Reseach*. 326: 483-504.

Fortin N, Agster K, Eichenbaum H. (2002). Critical role of the hippocampus in memory for sequence of events. *Nat Neurosci*. 5: 458-462.

Fukata Y, Fukata M. (2010). Protein palmitoylation in neuronal development and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci*. 11:161-175.

Fukata M, Fukata Y, Adesnik H Nicoll R, Brecht D. (2004). Identification of PSD-95 palmitoylating enzymes. *Neuron*. 44:987-996.

Fukata Y, Murakami T, Yokoi N, Fukata M. (2016). Local palmitoylation cycles and specialized membrane domain organization. *Curr Top Membr*. 77:97-141.

Barker G, Walburton E. (2011). When is the hippocampus involved in recognition memory? *J Neurosci*. 31: 10721-10731.

Ge Y, Dong Z, Bagot R, Howland J, Phillips A, Wong T, Wang Y. (2010). Hippocampal long term depression is required for the consolidation of spatial memory. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 107:16697-16702.

Geva-Sagiv M, Las L, Yovel Y, Ulanovsky N. (2015). Spatial cognition in bats and rats: from sensory acquisition to multiscale maps and navigation. *Nat rev Neuroscience*. 16:94-108.

Globa A, Bamji S. (2017). Protein palmitoylation in the development and plasticity of neuronal connections. *Current Opinion in Neurobiology*. 45:210-220.

Golub T, Wacha S, Caroni P. (2004). Spatial and temporal control of signaling through lipid rafts. *Curr Opin Neurobiol*. 14: 542-550.

Good M, Barnes P, Staal V, McGregor A, Honey R. (2007). Context- but not familiarity- dependent forms of object recognition are impaired following excitotoxic hippocampal lesions in rats. *Behav Neurosci*. 121: 218-223.

Greaves J, Chamberlain L. (2007). Palmitoylation-dependent protein sorting. *J Cell Biol*. 176: 249-254.

Hanus C, Ehlers M (2008). Secretory outposts for the local processing of membrane cargo in neuronal dendrites. *Traffic*. 9:1437-1445.

Helmunt J, Levental I. (2015). Structural determinants of protein partitioning into ordered membrane domains and lipid rafts. *Chemistry and Physics of Lipids*. 192:23-32.

Hering H, Lin C, Sheng M. (2003). Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines and surface AMPA receptor stability. *J Neurosci*. 22: 3262-3271.

Huang K, Yanai A, Kang R, Arstokaitis P, Simgaraja R, Metzler M, Mullard A, Haigh B, Gauthier-Campbell C, Gutekunst C. (2004). Huntingtin-interacting protein HIP14 is a palmitoyl transferase involved in palmitoylation and trafficking of multiple neuronal proteins. *Neuron*. 44:977-986.

Hyashi T, Thomas G, Huganir R. (2009). Dual palmitoylation of NR2 subunits regulates NMDA receptor trafficking. *Neuron*. 64:213-226.

Jeyifous O, Lin E, Chen X, Antinone S, Mastro R, drisdel R, Reese T, Green W. (2016). Palmitoylation regulates glutamate receptor distributions in postsynaptic densities through control of PSD95 conformation and orientation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113:8482-8491.

Jennings B, Nadolski M, Ling Y, Baker M, Harrison M, Deschenes R, Linder M. (2009). 2-bromopalmitate and 2-(2-hydroxy-5-nitro-benzylidene)-benzo[b]thiophen-3-one inhibit DHHC-mediated palmitoylation in vitro. *J Lipid Res.* 50:233-242.

Kandel E, Dudai, Y, Mayford M. (2014). The molecular and systems biology of memory. *Cell*. 157:163-186.

Kandel E, Pittenger C. (1999). The past, the future and the biology of memory storage. *Phi Trans R Soc Lond* 354: 2027-2052.

Kang R, Wan J, Arstikaitis P, Takahashi H, Huang K, Bailey A. (2008). Neural palmitoyl-proteomics reveals dynamic synaptic palmitoylation. *Nature*. 456:904-909.

Karakas E, Regan M, Furukawa H. (2015). Emerging structural insights into the function of ionotropic glutamate receptors. *Trends in Biochemical Science*. 40:328-337.

Klatzky R. (1998). Allocentric and egocentric spatial representations: definitions, distinctions, and interconnections. En: Freska C, Habel C, Wender K (eds). (1998) Spatial cognition. Berlin: Springer-Verlag. 1-17.

Kong E, Peng, S, Chandra G, Sarkar, C, Zhang Z, Bagh M, Mikherjee A. (2013). Dynamic palmitoylation links cytosol-membrane shuttling of acyl-protein thioesterase-1 and acyl-protein thioesterase-2 with that of proto-oncogene H-ras product and growth-associated protein-43. *J. Biol. Chem.* 288:9112-9125.

Langston R, Wood E. (2010). Associative recognition and the hippocampus: Differential effects of hippocampal lesions on object-place, object-context and object-place-context memory. *Hippocampus*. 20: 1139-1153.

Li Y, Hofer K, Wong A, Cooper J, Birnbaum S, Hammer R, Hofmann S. (2010). DHHC5 interacts with PDZ domain 3 of post-synaptic density-95 (PSD-95) protein and plays a role in learning and memory. *J Biol Chem*. 285:13022-13031.

Liang K, Hon W, Tyan Y, Liao W. (1994). Involvement of hippocampal NMDA and AMPA receptors in acquisition, formation and retrieval of spatial memory in the Morris water maze. *Chin J Physiol.* 37: 201-212.

Lin D, Conibear E. (2015). Enzymatic protein depalmitoylation by acyl protein thioesterases. *Biochem. Soc. Trans.* 43:193-198.

Lopez J, Gamache K, Schneider R, Nader K. (2015). Memory retrieval requires ongoing protein synthesis and NMDA receptor activity-mediated AMPA receptor trafficking. *J Neurosci.* 35: 2465-2475.

Maguire E, Burke T, Phillips J, Stauton H. (1996). Topographical disorientation following unilateral temporal lobe lesions in humans. *Neuropsychologia.* 34:993-1001.

Mathis A, Herz A, Stemmler M. (2012) Optimal population codes for space: grid cells outperform place cells. *Neural Comput.* 24:2280-2317.

McMichael T, Zhang L, Chemudupati M, Hach J, Kenney A, Hang H, Yount J. (2017). The palmitoyltransferase ZDHHC20 enhances interferon-induced transmembrane protein 3 (IFTM3) palmitoylation and antiviral activity. *Journal of Biological Chemistry.* 292:21517-21526.

Milnerwood A, Parsons M, Young F, Singaraja R, Franciosi S, Volta M, Bergern S, Hayden M, Raymond L. Memory and synaptic deficits in hip14/DHHC17 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci.* 110: 20296-20301.

Montersino A, Thomas G. (2015). Slippery signaling: Palmitoylation-dependent control of neuronal kinase location and activity. *Mol Membr Biol.* 32: 179-188.

Morgado I. (2005). Psicobiología del aprendizaje y la memoria: fundamentos y avances recientes. *Rev Neurol.* 40: 289-297.

Morris R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods.* 11: 47-60.

Morris R, Anderson E, Lynch G, Baudry M. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long term potentiation by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature.* 319:774-776.

Moult P, Gladding C, Sanderson T, Fizjohn S, Bashir Z, Molnar E, Collingridge G. (2006). Tyrosine phosphatase regulates AMPA receptor trafficking during metabotropic glutamate receptor-mediated long-term depression. *J Neurosci.* 26:2544-2554.

Naghdi N, Majlessi N, Bozorgmehr T. (2003). The effects of anisomycin (a protein synthesis inhibitor) on spatial learning and memory in CA1 region of rats hippocampus. *Behav Brain Res.* 139: 69-73.

Nakazawa K, Sun L, Quirk M, Rondi-Reig L, Wilson M, Tonegawa S. (2003). Hippocampal CA3 NMDA receptors are crucial for memory acquisition of one-time experience. *Neuron*. 24:305-315.

Noh K, Yokota H, Mashiko T, Castillo P, Zukin S, Bennet M. (2005). Blockade of calcium-permeable AMPA receptors protects hippocampal neurons against global ischemia-induced death. *PNAS*. 102:11230-122350.

Noritake J, Fukata Y, Iwanaga T, Hosomi N, Tsustnumi R, Matsuda N, Tani H, Iwanari H, Mochizuki Y, Kodama T. (2009). Mobile DHHC palmitoylating enzyme mediates activity-sensitive synaptic targeting of PSD95. *J. Cell Biol.* 156:147-160.

Ocampo A, Squire L, Clark R. (2018). The beneficial effect of prior experience on the acquisition of spatial memory in rats with CA1, but not hippocampal lesions: a possible role for schema formation. *Learn Mem.* 25: 115-121.

Ohno Y, Kihara A, Sano T, Igarashi Y. (2006). Intracellular localization and tissue-specific distribution of human and yeast DHHC cysteine-rich domain-containing proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1761:474-483.

Perusini J, Cajigas S, Cohensedgh O, Pavlova I, Donaldson Z, Denny C. (2017). Optogenetic stimulation of dentate gyrus engrams restores memory in alzheimer's disease mice. *Hippocampus*. 27:1110-1122.

Plant K, Pelkey K, Bortolotto Z, Morita D, Terashima A, McBain C, Collingridge G, Isaac J. (2006). Transient incorporation of native GluR2-lacking AMPA receptors during hippocampal long-term potentiation. *Nat Neurosci.* 9:602-604.

Rendeiro C, Spencer J, Vauzour D, Buller L, Ellis J, Williams C. (2009) The impact of flavonoids on spatial memory in rodents: from behaviour to underlying hippocampal mechanisms. *Genes Nutr.* 4:251-270.

Riedel G, Micheau J, Lam A, Roloff E, Martin S, Bridge H, de Hoz L, Poeschel B, McCulloch J, Morris R. (1999). Reversible neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes. *Nat Neurosci.* 2:898-905.

Riedel G, Platt B, Micheau J. (2003). Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav. Brain Res.* 140:1-47

Rocks O, Gerauer M, Vartak N, Koch S, Huang Z, Pechlivanis M, Kuhlmann J, Brunsveld L, Chandra A, Lilinger B. (2010). The palmitoylation machinery is a spatially organizing system for peripheral membrane proteins. *Cell.* 141:548-471.

Rodriguez-Ortiz C, García de la Torre P, Benavidez E, Ballesteros M, Bermudez-Rattoni F. (2008) Intrahippocampal anisomycin infusions disrupt previously consolidated spatial memory only when memory is updated. *Neurobiology of learning and memory.* 89:352-359.

Rossato J, Bevilaqua L, Myskiw J, Medina J, Izquierdo I, Cammarota M (2007). The role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learn Mem.* 14: 36-46.

Roth A, Wan J, Bailey A, Sun B, Kuchar J, Green W, Phinney B, Yates J, Davis N. (2006). Global analysis of protein palmitoylation in yeast cells. *Cell.* 125:1003-1013.

SAGARPA secretaría de agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2001). Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *Diario Oficial de la Federación.*

Salaun C, Greaves J, Chamberlain L. (2010). The intracellular dynamic of protein palmitoylation. *J. Cell Biol.* 191:1229-1239.

Sanderson T, Collingridge G, Fitzjohn S. (2011). Differential trafficking of AMPA receptors following activation of NMDA receptors and mGluRs. *Mol Brain.* 4:30-37.

Sans N, Vissel B, Petralia R, Wang Y, Chang K, Royle G, Wang C, O'Gorman S, Heinemann S, Wenthold R. (2003). Aberrant formation of glutamate receptor complexes in hippocampal neurons of mice lacking the GluR2 AMPA receptor subunit. *J Neurosci.* 23:9367-9373.

Smith M. (1988). Recall of spatial location by the amnesic patient H.M. *Brain Cogn.* 7:178-183.

Solstad T, Boccara C, Kropff E, Mosser M, Mosser E. (2008) Representation of geometric borders in the entorhinal cortex. *Science.* 322:1865-1868.

Solstad T, Moser E, Eivvoll G. (2006) From grid cells to place cells: A mathematical model. *Hippocampus.* 16:1026-1031.

Spiers H, Burgess N, Maguire E, Baxendale S, Hartley T, Thompson P, O'keefe J. (2001). Unilateral temporal lobectomy patients show lateralized topographical and episodic memory deficit in a virtual town. *Brain.* 124:2476-2489.

Spinelli M, Fusco S, Mainardi M, Scala F, Natale F, Lapenta R, Mattera A, Rinaudo M, Puma D, Ripoli C, Grassi A, Ascenzo M, Grassi C. (2017). Brain insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and memory by increasing GuA1 palmitoylation through FoxO3a. *Nat Commun.* 2009: 1-14.

Schulz P. (1997). Long-term potentiation involves increases in the probability of neurotransmitter release. *Proc. Natl Acad Sci.* 94: 5888-5893.

Sunyer B, Diao W, Lubec G. (2008). The role of post-translational modifications for learning and memory formation. *Electrophoresis.* 29:2593-2602.

Sutton M, Schuman E. (2006). Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity and memory. *Cell*. 127:49-58.

Takeuchi T, Duzskiewicz A, Morris R. (2014). The synaptic plasticity and memory hypothesis: encoding, storage and persistence. *Phil. Trans. R. Soc. B* 369: 1-14.

Van Dolah D, Mao L, Shaffer C, Guo M, Fibuch E, Chu X, Buch S, Wang J. (2011). Reversible palmitoylation regulates surface stability of AMPA receptors in the nucleus accumbens in response to cocaine in vivo. *Bio Psychiatry*. 69: 1035-1042.

Van Zundert B, Yoshii, A, Constantine-Paton M. (2004). Receptor compartmentalization and trafficking at glutamate synapses: a developmental proposal. *Trends Neurosci*. 27: 428-37.

Vartak N, Papke B, Grecco H, Rossmannek L, Waldmann H, Hedberg C, Bastiaens P. (2014). The autodepalmitoylating activity of APT maintains the spatial organization of palmitoylated membrane proteins. *Biophys J*. 106:93-105.

Villareal D, Do V, Haddad E, Derrick B. (2002). NMDA receptor antagonists sustain LTP and spatial memory: active processes mediate LTP decay. *Nat Neurosci*. 5:48-52

Vogel-Ciernia A, Wood M. (2014). Examining object location and object recognition memory in mice. *Curr Protoc Neurosci*. 69: 1-8

Vorhees C, Williams M. (2006). Morris Water Maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc*. 1:848-858.

Wenthold R, Sans N, Standley S, Prybylowki K, Petralia R. (2003). Early events in the trafficking of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. *Biochem Soc Trans*. 31: 885-888.

Wenthold R, Prybylowki K, Standley S, Sans N, Petralia R. (2003). Trafficking of NMDA receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 43: 335-358.

Winters B, Forwood S, Cowell R, Saksida L, Bussey T. (2004). Double dissociation between the effects of peri-posterior cortex and hippocampal lesions on tests of object recognition memory and spatial memory: heterogeneity of function within the temporal lobe. *J Neurosci*. 24: 5901-5908.

Yamada K, Arai M, Suenaga T, Ichitani Y. (2017). Involvement of hippocampal NMDA receptors in encoding and consolidation, but not retrieval, processes of spontaneous object location memory in rats. *Behav Brain Res*. 28: 14-19.

Yokoi N, Fukata Y, Sekiya A, Murakami T, Kobayashi K, Fukata M. (2016). Identification of PSD-95 depalmitoylating enzymes. *J Neurosci*. 36: 6431-6444.

Zhang X, Liu X, Wang D, Liu H, Hao W. (2011). Conditioned place preference associated with level of palmitoylation of PSD-95 in rat hippocampus and nucleus accumbens. *Neuropsychology*. 64: 211-218.