



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

PALMITOILACIÓN: MECANISMO ASOCIADO A LA FORMACIÓN Y EL  
MANTENIMIENTO DE LA MEMORIA ESPACIAL

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:  
M. C. OSCAR GIOVANNY URREGO MORALES

TUTOR PRINCIPAL:  
DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:  
DRA. MARTHA LILIA ESCOBAR RODRÍGUEZ  
FACULTAD DE PSICOLOGÍA  
DR. JAIME MAS OLIVA  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., OCTUBRE 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 (CONACyT), proyectos:

CONACYT 250870

CONACYT FOIINS 474

PAPIIT IN212919

CONACYT: CF-2023-I-189

DGAPA-PAPIIT-UNAM: IN 213123

También se agradece el apoyo del técnico académico Dr. Luis F. Rodríguez Durán.

## AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Federico Bermúdez Rattóni** por permitirme ser parte de su grupo de investigación, por la gran enseñanza durante todo este tiempo y por todo su apoyo durante mi formación académica.

A los integrantes de mi comité tutorial, **Dra. Martha Lilia Escobar** y **Dr. Jaime Mas Oliva** por las aportaciones tan valiosas durante el desarrollo del proyecto.

A los miembros del jurado, **Dra. Angélica Zepeda Rivera**, **Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez**, **Dr. Fatuel Tecuapetla Aguilar**, **Dr. Francisco Sotres Bayón** y **Dr. Ernesto Soto Reyes Solís** por los comentarios y sugerencias tan asertivos que sin duda mejoraron el contenido de la tesis.

A la **Dra. Ilse Delint Ramirez** por las aportaciones para la realización de esta tesis.

Al **Dr. Gerardo Ramírez Mejía** y la **Dra. Elvi Gil Lievana**, por su inconmensurable apoyo durante mi estancia doctoral en el ámbito académico. Pero aún más importante, agradezco por la profunda amistad que hemos forjado en estos años.

A la **MVZ. Claudia Rivera Cerecedo** y al **MVZ. Héctor Malagón**, por haber proporcionado los animales de experimentación para la realización de esta tesis.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	6
1.INTRODUCCIÓN .....	7
1.1 Modificaciones postraduccionales de las proteínas en el aprendizaje y la memoria.....	7
1.2 Palmitoilación de proteínas .....	10
1.3 Inhibición de las palmitoil acil transferasas.....	11
1.4 Palmitoilación de proteínas en el sistema nervioso central .....	14
1.5 Plasticidad sináptica en el hipocampo.....	16
1.6 Etapas de la memoria espacial .....	20
1.7 Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) .....	23
1.8 Sinapsina .....	25
1.9 BDNF y sinapsina: dos proteínas asociadas a la memoria espacial.....	25
2.JUSTIFICACIÓN Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	27
3.HIPÓTESIS.....	28
4.OBJETIVO GENERAL .....	28
4.1 Objetivos particulares .....	28
5.MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
5.1 Sujetos experimentales .....	29
5.2 Cirugía estereotáxica .....	29
5.3 Administración farmacológica intra hipocampal .....	29
5.4 Laberinto acuático de Morris (MWM) .....	30
5.5 Memoria de localización de objetos (OLM) .....	31
5.6 Memoria de reconocimiento de objetos (ORM) .....	32
5.7 Registros electrofisiológicos .....	33
5.8 Extracción y cuantificación de proteínas.....	34
5.9 Electroforesis e inmunoblot.....	35
5.10 Tinción de Nissl .....	36
5.11 Análisis de datos .....	36
6.RESULTADOS .....	37
6.1 La adquisición y la consolidación de la memoria espacial en el MWM depende de la actividad de las enzimas PATs. ....	37
6.2 La adquisición y consolidación de la memoria de localización de objetos depende de la actividad de las enzimas PATs.....	39
6.3 La inhibición de las enzimas PATs en el hipocampo no afecta la memoria independiente del hipocampo. ....	42

6.4 La inducción, pero no el mantenimiento de la potenciación a largo plazo requiere actividad de las enzimas PATs. ....	43
6.5 La inhibición de las enzimas PATs disminuye la expresión de proteínas involucradas en plasticidad sináptica y la consolidación de la memoria espacial. ....	45
7.DISCUSIÓN.....	48
8.CONCLUSIÓN.....	56
9.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	57
10.ANEXOS .....	73

## RESUMEN

La adición de lípidos es una modificación postraduccional ampliamente reconocida que desempeña un papel fundamental en la fisiología del sistema nervioso central. Uno de los mecanismos clave de esta adición lipídica es la palmitoilación de proteínas, que involucra la unión de un ácido graso de 16 carbonos, conocido como palmitato, a residuos de cisteína en las proteínas. Este proceso es mediado por enzimas llamadas palmitoil aciltransferasas (PATs) y desempeña un papel crucial en la regulación del tráfico de proteínas y su estabilidad en las membranas celulares. Investigaciones recientes han destacado la palmitoilación de proteínas como un regulador esencial de las funciones y la ubicación celular de las proteínas, con un impacto que se extiende desde minutos hasta horas en términos de temporalidad. El sistema nervioso central tiene un número significativo de proteínas sujetas a regulación mediante palmitoilación. En este contexto, las interacciones entre proteínas y lípidos, así como entre proteínas mismas, conforman un mecanismo altamente regulado, dinámico y complejo que desempeña un papel crítico en la modulación de las modificaciones neuronales necesarias para los procesos cognitivos, incluyendo el aprendizaje y la memoria. La palmitoilación de proteínas ha sido identificada como un factor determinante en la eficiencia y fuerza de las conexiones sinápticas, lo que resulta esencial para la formación de memorias estables y duraderas. A pesar de que se han realizado aproximaciones al estudio de la palmitoilación de proteínas en relación con la plasticidad sináptica, el aprendizaje y la memoria, las metodologías empleadas conllevan limitaciones en cuanto a la resolución espacial y temporal, lo que impide una comprensión completa de su contribución en las diversas etapas de la formación de la memoria. Por lo tanto, este estudio se propuso investigar el papel de la palmitoilación de proteínas en los mecanismos celulares asociados con la memoria espacial. Para ello, se utilizaron enfoques farmacológicos, electrofisiológicos y bioquímicos, aprovechando modelos de memoria espacial en ratas. Los resultados sugieren que la administración del inhibidor 2-bromopalmitato en el hipocampo dorsal interfiere con el proceso de aprendizaje de la memoria espacial. Sin embargo, se demostró que esta inhibición no afecta la expresión de la memoria espacial durante la fase de evocación. Además, se observó que la inhibición de las enzimas PATs en el hipocampo dorsal antes de la estimulación eléctrica de alta frecuencia impide la inducción de la potenciación a largo plazo (LTP). También se encontró que la inhibición de las enzimas PATs en el hipocampo dorsal después de la adquisición de la memoria espacial reduce la expresión de dos proteínas cruciales para la plasticidad neuronal: el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y la sinapsina (Syn). En conjunto, estos hallazgos respaldan la hipótesis de que la actividad de las enzimas PATs es esencial para la modulación de la plasticidad neuronal en el hipocampo, un proceso clave en la adquisición y consolidación de la memoria espacial.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Modificaciones postraduccionales de las proteínas en el aprendizaje y la memoria

Las modificaciones postraduccionales de las proteínas (MPP) se refieren a los cambios que ocurren en las proteínas una vez que el proceso de traducción ha finalizado (Ramazi & Zahiri, 2021). Estas modificaciones pueden ocurrir mediante la adición o eliminación de moléculas de naturaleza química diferente a la de los residuos de aminoácidos en las proteínas (Xiong et al., 2016; Xu & Chou, 2016). En general, las MPP alteran la estructura, estabilidad, localización, interacción y función de las proteínas, y en esta medida, las investigaciones han puesto en evidencia el papel crucial de las MPP en la fisiología del sistema nervioso central, a través de la modulación de la plasticidad sináptica, transducción de señales, interacciones proteína-proteína y la formación de la memoria, entre otros procesos (Sambataro & Pennuto, 2017; Smith & Carregari, 2022). Las MPP se clasifican a partir de la naturaleza química de los grupos funcionales añadidos o eliminados. A continuación, se describirán algunas de las MPP más importantes en el contexto de la plasticidad sináptica, el aprendizaje y la memoria, y en particular la acilación de proteínas, dentro de las cuales se encuentra la palmitoilación de proteínas, la cual, aunque se ha descrito en múltiples procesos celulares fisiológicos y patológicos, aún no está completamente descrita su participación en los procesos de formación y mantenimiento de la memoria.

- *Fosforilación de proteínas*

La fosforilación es una de las MPP más estudiadas y desempeña un papel fundamental en los procesos de aprendizaje y memoria (Sweatt, 2001). Las proteínas cinasas, como la proteína cinasa II dependiente de calcio/calmodulina (CaMKII) la proteína cinasa A (PKA) y la proteína cinasa C (PKC) regulan dinámicamente el estado de fosforilación de las proteínas implicadas en la plasticidad sináptica (Mizuno et al., 2002; Rosenegger et al., 2008; Craddock et al., 2012). En particular, los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) y los receptores de ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), ambos cruciales para la transmisión sináptica, sufren fosforilaciones en respuesta a la actividad neuronal (Corti & Duarte, 2023). Este proceso influye en el tráfico de receptores, la comunicación sináptica y la potenciación a largo plazo (LTP), mecanismos celulares que se consideran la base celular del aprendizaje y la memoria (Bye & McDonald, 2019).



- *Acetilación de proteínas*

La acetilación es la adición mediante una reacción química de un grupo funcional acetilo en un compuesto orgánico. A nivel biológico, la acetilación de proteínas es una MPP que permite la regulación funcional de las proteínas acetiladas. Las aproximaciones proteómicas han permitido la identificación de miles de proteínas acetiladas, incluyendo enzimas (Li et al., 2019), proteínas asociadas a la cromatina (Singh et al., 2010), p53 (Tang et al., 2008), tubulina (Nekooki-Machida & Hagiwara, 2020) e histonas (Shvedunova & Akhtar, 2022). En particular, la acetilación de histonas, una MPP asociada a mecanismos epigenéticos, es crucial para regular la expresión génica y la formación de memoria (Ramirez-Mejia et al., 2021). La acetilación de histonas es mediada por las histonas acetiltransferasas (HAT), que agregan grupos acetilo a las proteínas histonas, lo que da lugar a una estructura de cromatina abierta que promueve la transcripción (Marmorstein & Zhou, 2014). Por el contrario, las enzimas histonas desacetilasas (HDAC) eliminan los grupos acetilo, lo que provoca la compactación de la cromatina y la represión transcripcional (Slaughter et al., 2021). Algunos estudios han demostrado que los inhibidores de HDAC pueden mejorar la consolidación de la memoria y mejorar la función cognitiva (Peleg et al., 2010; Bahari-Javan et al., 2012). Además, la acetilación de proteínas diferentes a histonas, como factores de transcripción y proteínas sinápticas, también contribuye a los procesos de memoria (Guan et al., 2009; Stefanko et al., 2009).

- *Ubiquitinación de proteínas*

La ubiquitinación es un MPP que marca químicamente a las proteínas para su degradación a través del sistema ubiquitina-proteasoma (Tai & Schuman, 2008). En el contexto de la plasticidad sináptica, la ubiquitinación juega un papel en la regulación del recambio de proteínas involucradas en la transmisión y plasticidad sináptica (Schwartz, 2003; Luza et al., 2020). Por ejemplo, la proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad (Arc/Arg3.1), un regulador clave de la plasticidad sináptica, sufre ubiquitinación y degradación vía sistema ubiquitin-proteosoma después de la activación sináptica (Mabb & Ehlers, 2018). Este proceso ayuda a mantener la homeostasis sináptica y facilita la formación de memoria al controlar los niveles de proteínas específicas en las sinapsis (Hegde, 2016).

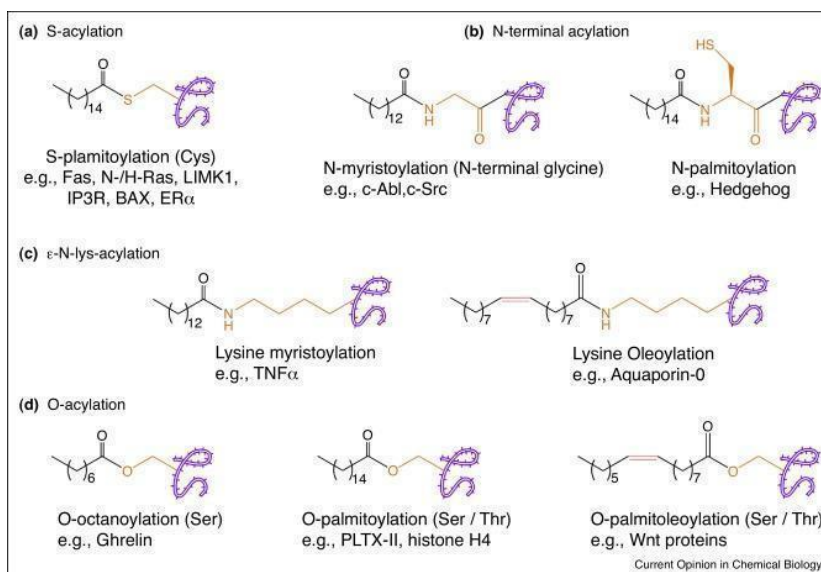
- *Glicosilación de proteínas*

La glicosilación, definida por la adición de residuos de azúcar a las proteínas, modula la función de las proteínas e influye en la adhesión celular (Reily et al., 2019). Las moléculas de

adhesión celular (CAM), cruciales para la formación y estabilización de sinapsis, se someten a glicosilación, lo que afecta sus propiedades adhesivas y conectividad sináptica (Bradberry et al., 2023). Los cambios en los patrones de glicosilación se han asociado con plasticidad sináptica alterada y problemas de aprendizaje en modelos animales (Inaba et al., 2016).

- *Acilación de proteínas*

Finalmente, las modificaciones por lípidos son un conjunto de procesos post-traduccionales que involucran la adición o eliminación de un lípido o una molécula similar a un lípido en las proteínas (Atukorala & Mathivanan, 2021). La adición de lípidos aumenta la hidrofobicidad de la proteína modificada, permitiéndole integrarse a la bicapa lipídica de la célula, un proceso fundamental para el tráfico de proteínas y la estabilidad en las membranas (Chamberlain & Shipston, 2015; Carnino et al., 2020). Existen varios tipos de modificaciones de proteínas por lípidos, según la longitud de la cadena de carbono en la molécula lipídica y el tipo de aminoácido en la estructura de la proteína a la cual se une la molécula lipídica (Resh, 2013; Jiang et al., 2018). La S-acilación es un tipo de proceso post-traduccionales en el que se une un ácido graso (con una longitud de cadena de carbono que varía entre 14 y 20) al residuo de cisteína en la proteína mediante un enlace tioéster. Durante este proceso, se pueden incorporar ácidos grasos de diferentes longitudes de cadena, como miristato (14:0), palmitato (16:0), estearato (18:0) y oleato (18:1) (Resh, 1999; El-Husseini et al., 2002; Buszka et al., 2023). Este tipo de modificaciones por acilación es el más común en las células, puesto que al medirse las cantidades de ácidos grasos en el sistema nervioso central, se ha reportado que el ácido palmítico, esteárico y mirístico pueden constituir el 86% de todos los ácidos grasos presentes (Narayana et al., 2015). De manera similar, se ha reportado que en células no neuronales, el palmitato representa aproximadamente el 75% de los ácidos grasos unidos a proteínas (de los cuales aproximadamente el 50% se identifican como una forma unida por éster), mientras que el miristato y el estearato contribuyen al 25% restante (Towler y Glaser, 1986). Otros estudios realizados en plaquetas y en la línea celular COS-1 también indican que el palmitato es el ácido graso predominante unido a los péptidos (Muszbek et al., 1999; Liang et al., 2002). Al ser el palmitato el grupo lipídico más comúnmente agregado a las cisteínas en el proceso de acilación, esta modificación también se conoce comúnmente como S-palmitoilación o simplemente palmitoilación (Buszka et al., 2023) (ver figura 1).



**Figura 1.** Tipos de acilaciones de proteínas celulares. (a) La acilación en el azufre ocurre en los residuos de cisteína, e incluye la palmitoilación. (b) La acilación N-terminal ocurre en las glicinas amino-terminales (N-miristoilación) y las cisteínas amino-terminales que experimentan una migración de acilo S-N (N-palmitoilación). (c) La acilación de lisina ocurre en los grupos N-epsilon-NH<sub>2</sub> de las cadenas laterales de lisina, e incluye  $\epsilon$ -N-lys-miristoilación y  $\epsilon$ -N-lys-oleoilación. (d) La O-acilación ocurre en los residuos de Ser o Thr, e incluye la O-octanoilación, la O-palmitoilación y la O-miristoilación. Los colores indican los residuos de aminoácidos clave necesarios para la acilación de grasas y también resaltan el enlace alqueno en los ácidos grasos insaturados (Adaptado y modificado de Hannoush, 2015). Adaptado con permiso del autor.

## 1.2 Palmitoilación de proteínas

A diferencia de la miristoilación y la prenilación, que son modificaciones estables y permanentes, la palmitoilación de proteínas es reversible debido a la labilidad de su enlace tioéster (Mumby, 1997; Hannoush, 2015). Esta modificación lipídica regula diversas funciones de las proteínas al modular su hidrofobicidad, lo que facilita sus interacciones con la bicapa lipídica hidrófoba de la membrana plasmática y las membranas intracelulares de los organelos, además de regular el tráfico vesicular de proteínas (Montersino & Thomas, 2015).

La palmitoilación de proteínas es de gran importancia biológica, ya que regula la localización, el recambio y el tráfico de proteínas (Shahid et al., 2020). Las alteraciones de la palmitoilación de proteínas están asociadas con enfermedades como cáncer, enfermedades cardiovasculares y trastornos neurológicos (Linder et al., 2007; Coleman et al., 2016; Noland et al., 2016). En este sentido, a palmitoilación de proteínas está regulada y mediada por un conjunto de enzimas pertenecientes a la familia de enzimas llamadas palmitoil acil transferasas (PATs), de las cuales se conocen 23 integrantes, que comparten un dominio zDHHC altamente conservado, ubicado entre los dominios transmembranales 2 y 3 (Mitchell

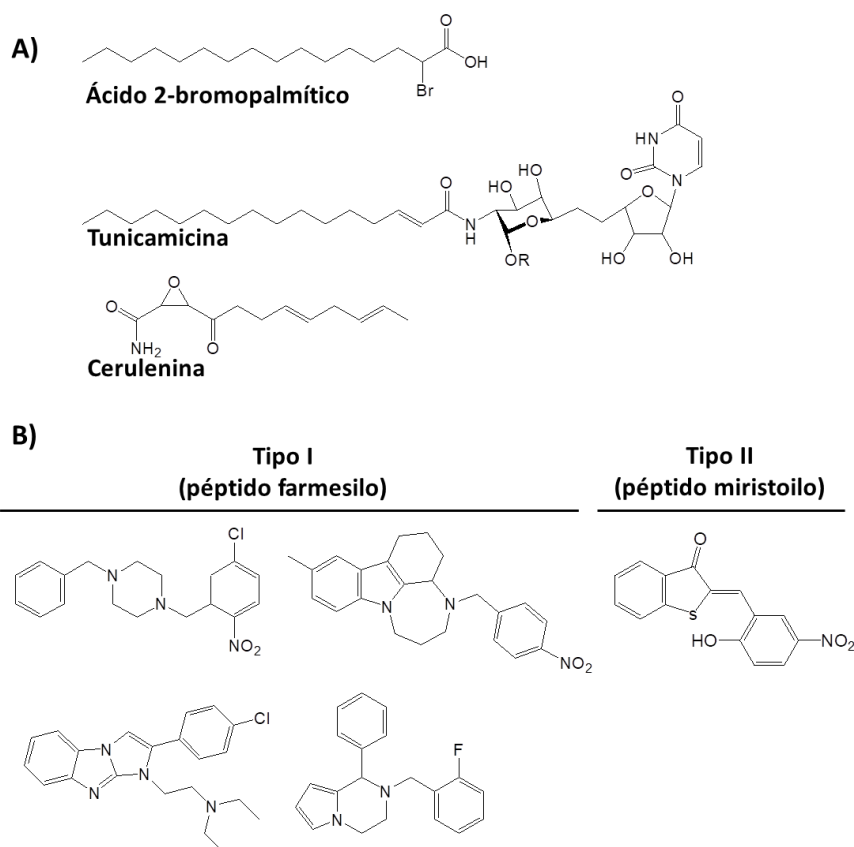
et al., 2006). Estas enzimas catalizan la adición reversible del palmitato a proteínas, lo que modula la interacción con membranas celulares, el tráfico intracelular y las interacciones entre proteínas (Conibear & Davis, 2010) (ver Figura 2).

El proceso de palmitoilación está altamente regulado, y cada enzima PAT es altamente específica por sus sustratos proteicos. Además de la especificidad de sustrato, se ha reportado que las PATs se regulan a través de mecanismos adicionales, como la regulación alostérica, la fosforilación y las interacciones proteína-proteína, lo que agrega complejidad a su función celular (Woodley & Collins, 2021).

### **1.3 Inhibición de las palmitoil acil transferasas**

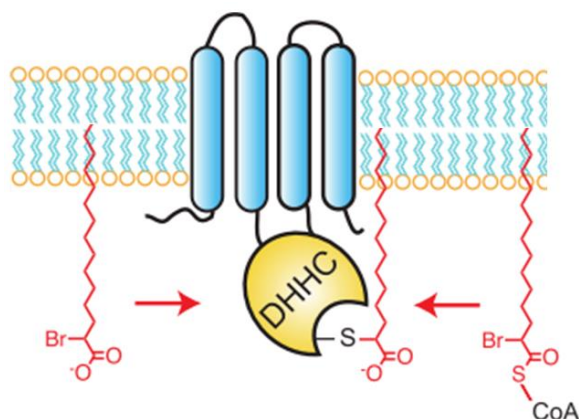
Actualmente, se han identificado muy pocos inhibidores farmacológicos de la palmitoilación de proteínas (Lan et al., 2021), y estos se pueden clasificar en dos grandes grupos: inhibidores lipídicos y no lipídicos. El desarrollo de inhibidores de la palmitoilación de proteínas responde a diversas necesidades, tanto en el ámbito experimental como en el terapéutico. En un contexto experimental, estos inhibidores han desempeñado un papel fundamental al permitir la identificación de procesos celulares que dependen de la palmitoilación de proteínas. Sin embargo, su relevancia no se limita solo a la investigación científica, ya que también tienen un impacto significativo en el tratamiento de enfermedades, como las enfermedades autoinmunes y el cáncer. Esto se debe a que los inhibidores de la palmitoilación de proteínas desempeñan un papel crucial en la modulación de la adecuada localización y actividad de proteínas que están directamente implicadas en estas enfermedades. Por ejemplo, proteínas como la Lck y H-Ras desempeñan roles fundamentales en la activación de células T y la desdiferenciación celular, respectivamente. Al intervenir en la palmitoilación de estas proteínas, los inhibidores pueden contribuir de manera significativa a la regulación de estos procesos biológicos y, por lo tanto, ofrecer nuevas oportunidades terapéuticas.

Los inhibidores lipídicos incluyen compuestos como el 2-bromopalmitato, la tunicamicina y análogos de cerulenina, los cuales tienen diversas dianas de inhibición, como las enzimas PATs (2-bromopalmitato, tunicamicina y cerulenina), enzimas que participan en el metabolismo de lípidos (2-bromopalmitato y cerulenina), y las enzimas que participan en la N-glicosilación de proteínas (tunicamicina) (Draper & Smith, 2009). Por otro lado, los inhibidores no lipídicos se dividen en compuestos tipo I y II (ver Figura 2), y han sido más estudiados en tratamientos contra el cáncer (Ducker et al., 2006).



**Figura 2.** Inhibidores de las enzimas palmitoil acil transferasas. En la parte A, se presenta la estructura química de los inhibidores lipídicos, mientras que en la parte B se muestran los inhibidores no lipídicos (Adaptado y modificado de Draper & Smith, 2009). Adaptado con permiso del autor.

El mecanismo molecular exacto por el cual la tunicamicina y la cerulenina ejercen su efecto inhibitorio sobre la palmitoilación de proteínas aún es desconocido. Sin embargo, se ha sugerido que podrían competir con el sustrato palmitoil-CoA por su unión a las PATs (Draper & Smith, 2009; Lan et al., 2021). Por otro lado, el 2-bromopalmitato ha sido identificado como un inhibidor de la palmitoilación de proteínas de amplio espectro. Es el único inhibidor de tipo lipídico validado en estudios *in vitro* y en modelos *in vivo*, con una clara evidencia de su actividad inhibitoria sobre las enzimas PATs (ver figura 3) (Lang et al., 2021).

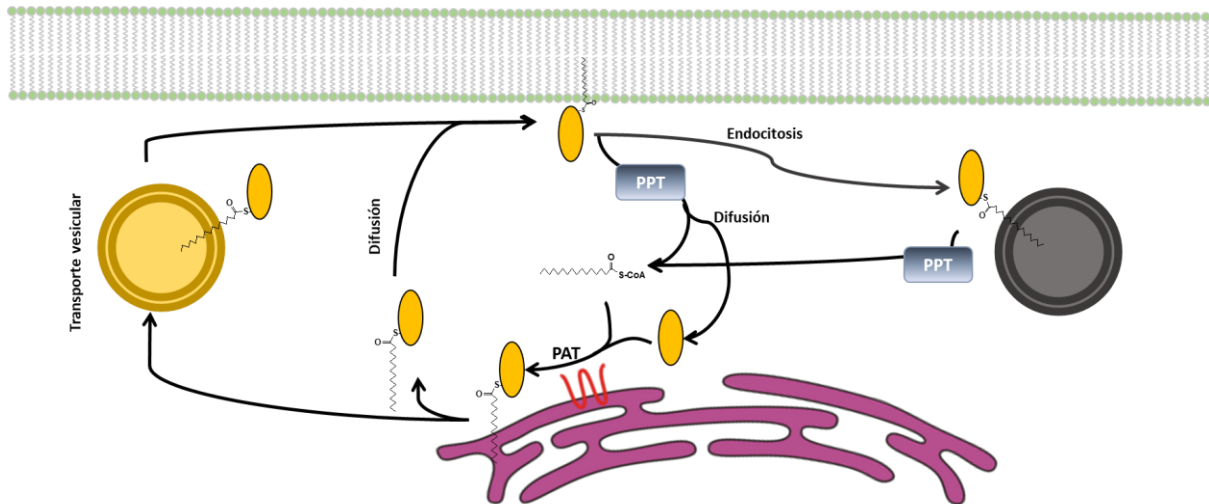


**Figura 3.** En las células, el 2-bromopalmitato se convierte en 2-bromopalmitoil-CoA, aunque con menor eficiencia que el palmitato libre. Una vez que se ha conjugado con la coenzima A (CoA), su capacidad de inhibición aumenta dramáticamente. Tanto el 2-bromopalmitato como el 2-bromopalmitoil-CoA muestran afinidad por el dominio DHHC de las palmitoil acil transferasas (PATs), enzimas que catalizan la s-palmitoilación (Adaptado y modificado de Davda et al., 2013). Adaptado con permiso del autor.

El inhibidor 2-bromopalmitato, también conocido como 2-bromohexadecanoico, ha sido objeto de estudio como inhibidor no selectivo de enzimas que participan en el metabolismo de lípidos durante aproximadamente 50 años. A pesar de su capacidad para inhibir enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos y proteínas de la membrana mitocondrial (Jennings et al., 2009), se ha reportado que actúa como un inhibidor general e inespecífico de las enzimas PATs. Este inhibidor ha sido usado para el estudio de metabolismo de lípidos, incluyendo la adipogénesis mediada por palmitato (Schmid et al., 2005) y la oxidación de ácidos grasos en la mitocondria (Chase & Tubbs, 1972). Además, se ha usado para investigar la participación de la palmitoilación de proteínas en vías de señalización celular en sistema inmunológico, metabolismo de azúcares, así como en modelos patológicos, incluyendo infecciones virales, enfermedades autoinmunes y cáncer (Coleman et al., 1992; Webb et al., 2000; Bekhouche et al., 2020; Chong et al., 2020; Hu et al., 2023; Zhou et al., 2023). La especificidad de esta inhibición depende de la concentración del 2-bromopalmitato, siendo aproximadamente 10 veces más afín a las enzimas PATs ( $IC_{50}=10-15 \mu M$ , en estudios *in vitro*) que a las enzimas del metabolismo lipídico ( $IC_{50}$  alrededor de  $100 \mu M$ , en estudios *in vitro*) (Zheng et al., 2013).

En el interior de las células, el 2-bromopalmitato entra en la vía metabólica y se convierte en 2-bromopalmitoil-CoA, aumentando así su afinidad por el dominio DHHC de las enzimas PATs (ver Figura 3). Gracias a la unión covalente con el dominio DHHC a través de un enlace tioéster, el 2-bromopalmitato se comporta como un inhibidor competitivo irreversible, bloqueando la actividad acil-transferasa y evitando la incorporación de nuevo palmitato en el

sitio activo de la enzima (Fukata & Fukata, 2010; Davda et al., 2013) (ver Figura 4). Por lo tanto, el 2-bromopalmitato ha sido utilizado como un inhibidor irreversible de la actividad de las enzimas PATs, cuya especificidad depende de la concentración del inhibidor. Esto abre una ventana de oportunidad para estudiar el efecto de la inhibición de la palmitoilación de proteínas en las diferentes fases de la formación y el mantenimiento de la memoria espacial.



**Figura 4.** Mecanismo celular del ciclo de palmitoilación y despalmitoilación de proteínas. Las palmitoil acil transferasas (PAT) catalizan la adición de grupos palmitoil a proteínas, promoviendo su inserción en la membrana celular mediante el tráfico vesicular o el movimiento libre desde el citoplasma o el retículo endoplásmico hacia la membrana. Por otro lado, las palmitoil tioesterasas (PPT) catalizan la eliminación del grupo palmitoil, promoviendo la endocitosis o internalización de proteínas mediante vesículas intracelulares (Adaptado y modificado de Fukata y Fukata, 2010). Adaptado con permiso del autor.

#### 1.4 Palmitoilación de proteínas en el sistema nervioso central

A nivel del sistema nervioso central, las interacciones postraduccionales son fundamentales para generar las modificaciones neuronales necesarias para la localización precisa y regulada de proteínas dentro de los compartimentos de la membrana axonal y dendrítica, el crecimiento axonal, la transmisión sináptica, la excitabilidad y sincronización neuronal (Philippe & Jenkins, 2019).

Más de la mitad de las enzimas PATs han sido encontradas en el cerebro y su distribución es heterogénea (Lein et al., 2007). Entre estas, las enzimas zDHHC 5, 9 y 17 se expresan en la mayor parte de las estructuras cerebrales. Sin embargo, otras enzimas PATs muestran patrones de expresión más específicos en determinadas estructuras cerebrales; por ejemplo,

las enzimas zDHHC 2 y 7 son ampliamente expresadas en las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo, mientras que las enzimas zDHHC 6 y 7 están fuertemente expresadas en las células purkinje del cerebelo (Zhang et al., 2014).

Además, un alto porcentaje de las proteínas presinápticas y postsinápticas han sido identificadas como sustratos de las enzimas PATs (Sanders et al., 2015). Muchas de estas proteínas presentan una alta tasa de recambio en su dinámica de palmitoilación/despalmitoilación (Globo & Bamji, 2017). Se han identificado enzimas PATs que se expresan exclusivamente en el axón, como la enzima zDHHC 17, otras solo en las dendritas, como las enzimas zDHHC 1, 2, 5, 8 y 12; mientras que algunas se encuentran en la membrana celular o en compartimentos postsinápticos. Interesantemente, la distribución de las enzimas PATs también es alterada por la actividad neuronal, como se observa con las enzimas zDHHC 2, 5 y 8, los cuales se redistribuyen en los compartimentos postsinápticos en respuesta a la actividad neuronal (Brigidi et al., 2015; Woolfrey et al., 2015; Thomas et al., 2012; Fukata et al., 2013).

Esta redistribución dependiente de la actividad también está relacionada con la regulación de la actividad de las enzimas PATs. Aunque los mecanismos de regulación de la actividad de estas enzimas aún no se conocen en su totalidad, se ha sugerido que el tráfico de enzimas PATs inducido por la actividad neuronal y la alteración de la estructura terciaria para acercar el sitio activo al sustrato proteico son mecanismos que permiten regular la palmitoilación de proteínas dependiente de la actividad. Estos mecanismos reguladores de la actividad de las enzimas PATs permiten, de forma concertada con la actividad de las enzimas palmitoil acyl tioesterasas, modular los ciclos de palmitoilación/despalmitoilación de proteínas y regular diversas vías de señalización celular. Por ejemplo, la enzima zDHHC 5, que está regulada por la actividad sináptica, se localiza en la membrana plasmática en condiciones basales, donde interactúa con PSD-95 y la cinasa Fyn, formando un complejo proteico. Sin embargo, el incremento de la actividad neuronal desestabiliza el complejo zDHHC5/PSD-95/cinasa Fyn, lo que provoca la translocación de la enzima zDHHC 5 hacia el retículo endoplásmico, donde interactúa con otras proteínas como la fosfatasa enriquecida en el estriado (STEP), que regula la cinasa Fyn. Este cambio de localización dependiente de la actividad sináptica favorece la interacción de las enzimas PATs con diferentes dianas proteicas según los requerimientos celulares (Yokoi et al., 2016; Noritake et al., 2009).

Aunque numerosas evidencias sugieren un papel funcional de la palmitoilación de proteínas en los procesos de transmisión y plasticidad neuronal a nivel del sistema nervioso central (El-Husseini & Brecht, 2002; El-Husseini et al., 2002; Fukata & Fukata, 2010), existen pocas



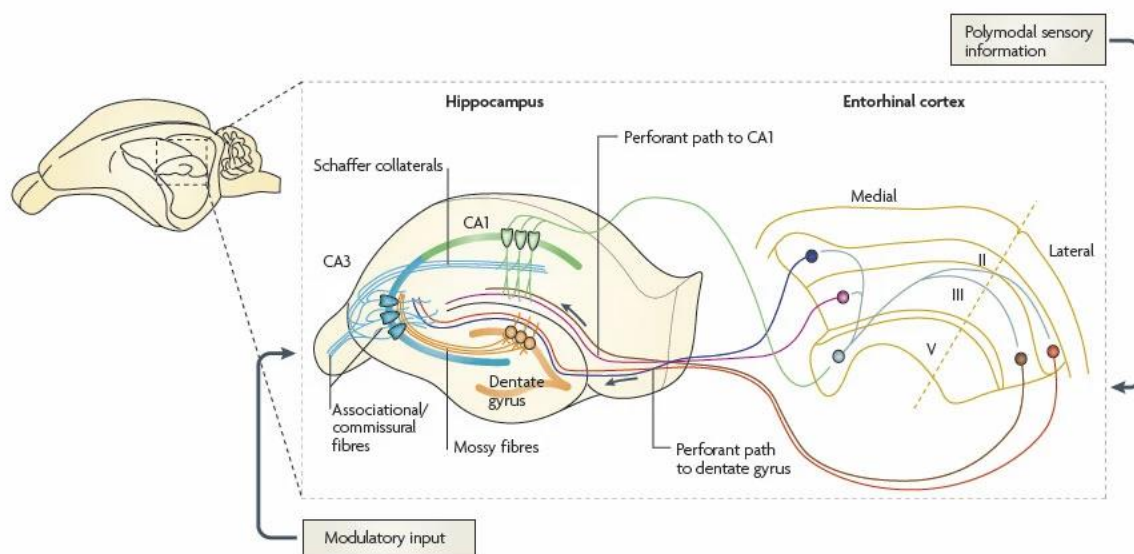
evidencias que sugieren un papel de la palmitoilación de proteínas en los procesos de aprendizaje y memoria (Li et al., 2010; Milnerwood et al., 2013, Brigidi et al., 2014).

### **1.5 Plasticidad sináptica en el hipocampo**

Las evidencias experimentales han sugerido que el hipocampo es esencial en la codificación y almacenamiento de información espacial (Morris et al., 1982; Lavenex & Amaral, 2000; Pothuizen et al., 2004). Se ha observado que algunas neuronas hipocampales se activan selectivamente dependiendo del contexto en el que se encuentra el sujeto (Hasselmo & Eichenbaum, 2005). Es decir, la actividad de estas neuronas cambia dependiendo del entorno o experiencia en la que el individuo está expuesto, lo que sugiere que el hipocampo participa en el procesamiento de la información contextual y en la formación de representaciones cognitivas del espacio y del entorno en el que se mueve el organismo.

La formación hipocampal es una estructura cerebral ubicada en el lóbulo temporal, y se caracteriza por su organización y conectividad celular distintiva, formando un complejo de estructuras interconectadas llamado sistema cortico-hipocampal (Jeffery & Hayman R., 2004). Este sistema cortico-hipocampal está formado por cortezas cerebrales, tales como la corteza temporal, corteza frontal, corteza cingulada anterior, corteza prelímbica e infralímbica, entre otras. En conjunto, estas regiones corticales están altamente interconectadas y procesan e integran información de múltiples regiones cerebrales (Goto, 2022). Estas estructuras corticales están conectadas con la región parahipocampal (corteza postrhinal y perirhinal), las cuales permiten la entrada de información relacionada con la posición relativa de un objeto en el espacio (Shastri, 2002; Cooper & Ritchey, 2019). Ambas cortezas de la región parahipocampal se conectan mutuamente con las regiones *Cornu ammonis* (CA)1, CA3, el giro dentado y el subículo (formando el circuito trisináptico), de forma bidireccional, a través de la corteza entorhinal. Por lo tanto, las fibras glutamatérgicas de la corteza entorhinal constituye la principal vía de entrada de información hacia las estructuras hipocampales, a través de la vía perforante, y formando sinapsis con las neuronas granulares del giro dentado, CA1 y CA3. A su vez, las células granulares del giro dentado hacen sinapsis con las neuronas piramidales del área CA3, a través de las fibras musgosas (O'Keefe & Dostrovsky, 1971; Vazdarjanova & Guzowski, 2004; Pfeiffer & Foster, 2013; Guan et al., 2021) (ver figura 5).

La bidireccionalidad de los circuitos parahipocampales con las estructuras hipocampales permite el flujo de información hacia y desde el hipocampo, logrando el retorno de la información procesada en el hipocampo hacia las estructuras corticales primarias, y a estructuras subcorticales, que conectan con el hipocampo a través de las fibras nerviosas en el fornix (Neves et al., 2008). Dentro de este circuito, la información se procesa preferencialmente de manera unidireccional y se propone que la formación hipocampal funciona en conjunto para la ejecución de procesos cognitivos y de memoria (Sweatt, 2001).



**Figura 5.** Representación del circuito trisináptico del hipocampo. La corteza entorrinal (Entorhinal Cortex) lateral y medial envía información sensorial polimodal desde las neuronas de la capa II hacia el giro dentado (Dentate gyrus) a través de los axones de la vía perforante (Perforant path). El giro dentado envía proyecciones a la región CA3 mediante las fibras musgosas (mossy fibers). CA3, a su vez, proyecta hacia la región CA1 a través de las colaterales de Schaffer (Schaffer collaterals). Además del circuito trisináptico secuencial, también existe una red asociativa densa que interconecta células CA3 en el mismo lado. También, CA1 recibe información directa de las células de la capa III de la corteza entorrinal (Tomado de Neves et al., 2008). Reproducido con permiso del autor.

Las primeras investigaciones que permitieron estudiar la participación del hipocampo en la memoria espacial, fue a través del estudio de casos clínicos, como Henry Molaison, cuyo hipocampo y estructuras adyacentes al lóbulo temporal medial fueron removidas, lo cual generó problemas para recordar la localización específica de objetos cotidianos (Smith, 1986). Aunque recientemente se han generado controversias respecto a la precisión de la cirugía hipocampal y se ha hipotetizado que la amnesia retrograda de Henry Molaison era una consecuencia de la combinación de fármacos antiepilépticos y las continuas convulsiones, indiscutiblemente ofreció una nueva perspectiva sobre la función de las áreas cerebrales, en particular, el papel del hipocampo en los procesos de memoria. Tiempo después, en 1971, O'Keefe & Dostrovsky descubrieron las células de lugar, demostrando que

el espacio puede ser codificado mediante el patrón de disparo de las neuronas hipocampales. Simultáneamente con estos estudios, Bliss & Lomo en 1973, descubrieron que la estimulación de alta frecuencia de los circuitos hipocampales mejoraba la eficacia de la transmisión sináptica, describiendo la potenciación de largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés). Estos experimentos de LTP en el hipocampo apoyaron la teoría de Donald Hebb sobre la representación neuronal de la memoria (Brown, 2020). La LTP es considerada uno de los modelos clave para el estudio de la plasticidad sináptica y se cree que está relacionada con los procesos de almacenamiento de la memoria (Villarreal et al., 2002). La LTP puede separarse en dos fases: inducción y mantenimiento. La inducción de la LTP produce cambios morfológicos en las espinas dendríticas, lo que permite fortalecer las sinapsis existentes o formar nuevas sinapsis, contribuyendo al fortalecimiento de la comunicación neuronal (Lamprecht & LeDoux, 2004). Este proceso de inducción se puede dividir en dos momentos distintos en términos de la frecuencia e intensidad de la comunicación neuronal (Hayashi, 2022). En el primer momento, los cambios son de corta duración y están asociados con la facilitación de la comunicación neuronal sin alterar la cantidad de receptores o proteínas asociadas a la estabilidad neuronal. Sin embargo, ocurren modificaciones que alteran la función de estas proteínas, y esto ocurre de manera independiente de la síntesis de proteínas. En el segundo momento, si la estimulación que induce el cambio se mantiene durante más tiempo, se activan mecanismos neuronales que llevan a la expresión de genes asociados con el mantenimiento o fortalecimiento de la sinapsis (Bradshaw et al., 2003; Baltaci et al., 2019). Esto incluye el aumento en la cantidad de receptores y la expansión de la superficie de contacto mediada por proteínas del citoesqueleto y de contacto célula-célula (Bozdagi et al., 2000), lo cual depende de la síntesis de proteínas. Por lo tanto, el estudio de la plasticidad sináptica a través de la LTP ha permitido identificar y caracterizar los mecanismos celulares que subyacen al almacenamiento de la memoria (Abel & Lattal, 2001).

La plasticidad sináptica es un proceso neurofisiológico fundamental que permite a las neuronas modificar la fuerza de sus conexiones en respuesta a estímulos externos, lo que juega un papel crucial en el desarrollo y reorganización neuronal (Turrigiano & Nelson, 2004; Von Bernhardi et al., 2017). Los mecanismos moleculares de la plasticidad sináptica en el hipocampo involucran muchas proteínas reguladoras y estructurales (Shahoha et al., 2022). El orden de las interacciones que involucran a estas proteínas y la contribución que cada una de ellas tiene en la plasticidad sináptica, aún se sigue estudiando. Sin embargo, se ha descrito que la activación de las sinapsis a través de la LTP se produce mediante la liberación de glutamato, que activa los receptores ionotrópicos AMPA (AMPAr). Esto produce la entrada de iones de sodio ( $\text{Na}^+$ ) y calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), lo que resulta en la despolarización de la neurona postsináptica. Posteriormente, esta despolarización local permite que los receptores NMDA

(NMDAr) eliminan los iones de magnesio ( $Mg^{2+}$ ) que bloquean los canales, lo que permite una gran entrada de iones de calcio ( $Ca^{2+}$ ) en la neurona postsináptica a través de los canales NMDAr y otros canales de calcio dependientes del voltaje que se encuentran en la misma neurona (Lisman & Zhabotinsky, 2001; Matsuzaki et al., 2004; Wu et al., 2017; Díaz-Alonso & Nicoll, 2021). Varias proteínas, como las cinasas CaMKII, PKC, PKA, ERK, entre otras, pueden activarse y funcionar como reguladores positivos en las diferentes etapas de la LTP (Xia & Storm, 2005; Penzes et al., 2008). Por ejemplo, el incremento en la concentración de cAMP activa a la vía de señalización MAPK/ERK permitiendo la translocación al núcleo de MAPK, mientras que cAMP activa a ERK en la región de CA1 del hipocampo (Adams & Sweatt, 2002). Se ha propuesto que la activación de AMPc, así como CREB, incrementa los niveles de BDNF, permitiendo la inducción de la LTP en CA1 y en el giro dentado (Gooney & Lynch, 2001; Leal et al., 2014). También se ha reportado que proteínas presinápticas como sinapsina, sinaptofisina y sinaptotagmina son activadas por CaMKII lo que contribuye al incremento en la liberación de neurotransmisores en la sinapsis (Tao-Cheng et al., 2006; Hung et al., 2014).

La plasticidad sináptica se estudia a través de los modelos de plasticidad hebbiana, en forma de potenciación (LTP) y depresión (LTD) a largo plazo, sustrato de la mayoría de los modelos de aprendizaje y memoria (Abbott and Nelson, 2000). Tanto en la LTP como en la LTD, se observan dos procesos: la inducción y el mantenimiento de la potenciación. La inducción es un proceso mediante el cual la señalización celular se activa como consecuencia de la estimulación de alta o baja frecuencia. Esta señalización celular induce un cambio en la sinapsis que puede detectarse como un aumento o disminución en la transmisión sináptica. Una vez que cambia la transmisión, el mantenimiento perpetúa el estado a pesar de la difusión y el recambio de las moléculas, así como cualquier otro proceso que participa en las reacciones bioquímicas inversas (Hayashi, 2022). En este sentido, las aproximaciones electrofisiológicas permiten estudiar la plasticidad sináptica desde diferentes niveles. A nivel de comunicación basal, los registros del comportamiento eléctrico en un circuito neuronal permiten establecer los mecanismos celulares independientes de actividad como consecuencia de un estímulo, es decir, permite conocer la actividad y los mecanismos celulares y moleculares sin aprendizaje (Patterson et al., 1996). Por otro lado, a nivel de la LTP y LTD, la estimulación de pulsos pareados se usa para caracterizar sistemas dinámicos, puesto que permite estudiar las diferencias en las respuestas a dos estímulos idénticos secuenciales en función del intervalo entre estímulos proporcionan información cuantitativa del sistema dinámico (Bouteiller et al., 2010). En este sentido, la estimulación de pulso pareados permite determinar mecanismos presinápticos que contribuyen en los procesos de plasticidad sináptica (Fernández-Fernández et al., 2015).

## **1.6 Etapas de la memoria espacial**

El aprendizaje implica la adquisición de nueva información proveniente del ambiente, mientras que la memoria es el almacenamiento de esta información, lo que provoca un cambio en la conducta basado en la experiencia (Kandel, 2001; Sunyer et al., 2008). La memoria se mide a través de los cambios en el comportamiento del sujeto, tiempo después del aprendizaje (Abel & Lattal, 2001). Debido a que los eventos celulares y moleculares para el almacenamiento de la información ocurren de forma ordenada temporalmente en el sistema nervioso central, la memoria se divide en tres etapas: la adquisición, la consolidación y la evocación (Bourtchouladze et al., 1998; McGaugh, 2000; Abel & Lattal, 2001).

### **Adquisición**

Los estudios acerca de los mecanismos celulares de la memoria se han centrado principalmente en la fase de adquisición. Este énfasis se debe en gran parte a todos los hallazgos realizados en modelos celulares de aprendizaje, incluyendo la plasticidad sináptica, específicamente la potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés) (Bliss, 1993; Shors & Matzel, 1997; Malenka & Nicoll, 1999; Fell & Axmacher, 2011). La adquisición de la memoria espacial es el proceso mediante el cual los organismos incorporan información espacial y generan una representación espacial de uno o varios objetos (Pilly & Grosseberg, 2012).

Las investigaciones que vinculan la LTP en el hipocampo con el aprendizaje espacial fueron desarrolladas por Carol Barnes y Morris, en tareas espaciales dependientes de hipocampo (Jeffery & Morris 1993; Brun et al., 2001; Barnes et al., 1992, 1994). Carol Barnes estudió los efectos de la LTP en animales jóvenes y viejos, observando que la magnitud de la LTP en el giro dentado de las ratas jóvenes es mayor que en las ratas viejas, y esta magnitud se correlaciona con de forma directamente proporcional con la ejecución de las tareas espaciales después del entrenamiento (Barnes et al., 2000). Casi al mismo tiempo, Morris desarrolló el laberinto acuático de Morris (MWM, por sus siglas en inglés) para estudiar la participación del hipocampo en la memoria espacial. En la tarea MWM, los animales deben aprender a localizar una plataforma oculta, trepar y permanecer en la plataforma, luego, deben generar una representación espacial de la plataforma de forma alocentrica usando las señales adicionales al laberinto (Morris, 1984). Usando este modelo, se reportó que la actividad de los receptores NMDA y la plasticidad sináptica dependiente de los receptores NMDA en la región CA1 del hipocampo es crucial para la adquisición de la memoria espacial (Graham & Collingridge, 1985; Morris et al., 1986). Además del CA1, se han descrito redes neuronales recurrentes en el área CA3 que también participan en la adquisición de la memoria espacial,

incluyendo las sinapsis de las neuronas colaterales en el área CA3 y las sinapsis que se forman por las neuronas de la vía perforante y que conectan con la región CA3 (Lee & Kesner, 2002; Nakazawa et al., 2004; Gilbert & Brushfield, 2009). Al igual que en el área CA1, la LTP en estos circuitos del área CA3 son dependientes de los receptores NMDA. Sin embargo, se han reportado mecanismos de LTP independientes de los receptores NMDA en las conexiones entre las fibras musgosas y CA3 (Armstrong et al., 2006; Kwon & Castillo, 2008).

## **Consolidación**

Se ha sugerido que el trazo de memoria en un inicio es frágil y se hace más permanente a través de cambios sinápticos, celulares y moleculares que marcan la transición de la plasticidad sináptica a través de un proceso llamado consolidación de la memoria, el cual requiere síntesis de proteínas (McGaugh, 2000; Nader, 2003; Cowan, 2008; Norris, 2017). En los organismos con un sistema nervioso complejo, la información de una memoria puede ser almacenada por segundos o incluso por años, por lo que se han propuesto dos tipos de memoria: corto (del inglés, short term memory STM) que dura minutos a horas y largo plazo (del inglés, long term memory LTM) que puede durar horas, días o años (Nader, 2003; Clopath, 2012). A diferencia de la LTM, la STM no depende de la síntesis de proteínas (Alkon et al., 2005; Balderas et al., 2008).

La consolidación de la memoria ocurre a través de cambios funcionales y morfológicos en las sinapsis, sitios especializados entre las neuronas para su comunicación (Martin et al., 2000; Martin & Morris 2002; Sutton & Schuman, 2006). Las sinapsis están compuestas de proteínas, las cuales son necesarias para múltiples procesos neuronales como los cambios en la transmisión y la regulación de la función sináptica, sin embargo, las proteínas tienen un tiempo de vida media relativamente corto, por lo cual, deben reemplazarse continuamente (Wu et al., 2016). Además, los cambios funcionales en las sinapsis exigen recambios continuos en el contenido proteínico en términos de cantidad, distribución y modificaciones postraduccionales (Hanus & Schuman, 2013). La regulación del contenido proteínico en las sinapsis es altamente dinámico y específico debido a que se necesitan preservar los cambios inducidos por señales fisiológicamente relevantes y realizar el recambio de proteínas únicamente donde y cuando se requieran (Costa-Mattioli et al., 2009; Sheehan et al., 2016). En términos generales, los procesos biológicos que median la consolidación de la memoria involucran numerosos eventos moleculares y celulares estrictamente regulados (Gal-Ben-Ari et al., 2012; Clopath, 2012). Estos procesos incluyen: la transcripción de RNA mensajero (mRNA), la síntesis de proteínas, degradación y tráfico de proteínas, modificaciones postraduccionales como fosforilación, ubiquitinación, así como mecanismos epigenéticos (Rajasehupathy et al., 2009; Giese & Mizuno, 2013; Gräff & Tsai, 2013; Saha & Dudek, 2013).

Dichos procesos son específicos en distintas regiones del cerebro (Spacek & Harris, 1997). Por ejemplo, en el hipocampo se ha reportado que la vía de señalización ERK/CREB en la región CA1 se activa aproximadamente 9 horas después del entrenamiento para que la memoria espacial sea consolidada (Trifilieff et al., 2006). También se ha reportado que proteínas como las neurotrofinas, específicamente el BDNF en la región CA1 del hipocampo es necesario para inducir la LTP y consolidar la memoria espacial (Mizuno et al., 2003; Hwang et al., 2006; Sun et al., 2021).

## **Evocación**

La evocación es la fase de la memoria donde se usa la información previamente almacenada en el sistema nervioso central (Kandel et al., 2014). La evocación de una memoria es inducida por estímulos sensoriales, que funcionan como claves externas, o por claves internas en el organismo, que modifican el comportamiento del organismo como consecuencia de las experiencias previas (Frankland et al., 2019). Los estudios pioneros de Tulving & Pearlstone en los años sesenta, establecieron que, la evocación de la memoria puede ocurrir en presencia, solamente, de los estímulos o claves que fueron presentadas durante la adquisición, pero no de otras. Estos estudios permitieron desarrollar los conceptos de disponibilidad y accesibilidad de la información. La disponibilidad de la información se refiere a que dicha información se encuentra almacenada en el sistema nervioso central, mientras que la accesibilidad de la información se refiere a la capacidad del sistema nervioso central de acceder y usar dicha información para evocar una memoria (Tulving & Pearlstone, 1966).

Se conocen algunos aspectos neurobiológicos que subyacen a la evocación de la memoria, especialmente en el hipocampo de mamíferos. Las neuronas de lugar, las cuales se activan cuando el animal se encuentra en contextos espaciales específicos, permiten la formación de mapas espaciales para el reconocimiento de ambientes específicos. En conjunto con estructuras como la corteza entorrinal y la corteza perirrinal, el hipocampo integra información multimodal para formar mapas de cada ambiente específico, incluyendo objetos y eventos (Tanaka et al., 2014; Okuyama et al., 2016; Roy et al., 2016; Perusini et al., 2017). La evocación de la memoria espacial ocurre mediante la activación del circuito que codifica para el mapa espacial requerido, coordinado con la integración de la actividad cortical. En este sentido, algunos reportes sugieren que, la manipulación de los engramas neuronales hipocampales que participan en la adquisición de la información espacial, son suficientes para impedir o activar la evocación de la memoria (Tonegawa et al., 2015). Igualmente, la detección de proteínas generadas por la expresión de genes de expresión temprana, indican un porcentaje significativo de neuronas que forman parte de los ensamblajes neuronales activados durante la adquisición y que se reactivan durante la evocación en la región CA1

(Guzowski et al., 1999). Sin embargo, a medida que se distancian temporalmente las sesiones de adquisición y de evocación, se reactiva un menor porcentaje de neuronas (Josselyn & Tonegawa, 2020). Una posible explicación de este fenómeno implica que las neuronas de la región CA1 codifican adicionalmente información temporal, puesto que la tasa de disparo se va modificando a lo largo del tiempo, mientras que las neuronas CA3, las cuales tienen una tasa de disparo constante a lo largo del tiempo, codifican información espacial (Ben-Yakov et al., 2015).

Finalmente, mientras que la actividad de los receptores glutamatérgicos de NMDA es fundamental para los procesos de adquisición y consolidación de la memoria espacial en el hipocampo, la evidencia reportada sugiere que la evocación no requiere de la actividad de dichos receptores, puesto que el bloqueo farmacológico de los receptores NMDA en el hipocampo antes de la prueba de evocación, no impide la expresión conductual de la memoria espacial (Steele & Morris, 1999). Por otra parte, se ha sugerido que la actividad de los receptores NMDA en la región CA3 tampoco es necesaria durante la evocación de la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris cuando las claves espaciales durante la adquisición se mantienen durante la evocación (Nakazawa et al., 2002). Sin embargo, en los protocolos del laberinto acuático de Morris que cambian parcialmente la posición de las pistas espaciales durante la evocación, se observa una mayor dependencia de la actividad de los receptores NMDA para la evocación de la memoria espacial (Morris, 2013).

### **1.7 Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)**

El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) es una proteína clasificada como un factor de crecimiento que regula diversos aspectos celulares, incluyendo la supervivencia, proliferación, migración y diferenciación. Desde etapas tempranas del desarrollo, el BDNF se expresa en muchos tejidos, siendo especialmente relevante su expresión en el sistema nervioso central y en regiones cerebrales clave para la formación de la memoria, como el hipocampo (Conner et al., 1997; Aid et al., 2007).

El BDNF se produce inicialmente como una forma pre-pro-BDNF (247 aminoácidos) que posteriormente madura a pro-BDNF (229 aminoácidos). Finalmente, el pro-BDNF se corta y madura para convertirse en la forma madura de la proteína (119 aminoácidos, 15 kDa) (Andero et al., 2014; Lessmann y Brigadski, 2009; Pang et al., 2004). El BDNF maduro se encuentra enriquecido en dendritas y axones, lo que se asocia con el fortalecimiento de las



sinapsis (Yan et al., 2007). Aunque las neuronas secretan principalmente BDNF, actualmente se debate si el pro-BDNF también puede estar involucrado en la regulación de la plasticidad neuronal (Matsumoto et al., 2008).

Los receptores tirosina cinasa B (TrkB) son los receptores activados por el BDNF y se consideran de alta afinidad, mientras que los receptores TrkA, TrkC y p75 son de baja afinidad. La activación de los receptores TrkB desencadena tres vías principales de señalización: 1) la vía de Ras-Raf, 2) la vía de fosfatidil inositol-3-cinasa-AKT (PI3K-AKT) y 3) la vía de fosfolipasa C-proteína cinasa C (PLC-PKC) (Minichiello, 2009; Walsh & Tschakovsky, 2018). Estas vías de señalización activadas por el BDNF desencadenan procesos celulares como el crecimiento, la diferenciación, la migración y la supervivencia celular, así como la regulación del proceso inflamatorio, el ciclo y el metabolismo celulares. Además, favorecen la activación de factores de transcripción asociados con la plasticidad neuronal y el crecimiento celular (Vaynman et al., 2003; Minichiello, 2009; Scott-Solomon & Kuruvilla, 2018).

La proteína BDNF participa de forma crucial durante los cambios en la fortaleza sináptica dependientes de actividad y se considera fundamental para los procesos de aprendizaje y memoria. De hecho, se ha reportado que, durante la adquisición y la consolidación de la memoria espacial, la expresión del mRNA de BDNF y la activación del receptor TrkB incrementan (Yamada & Nabeshima, 2003). En este sentido, las aproximaciones genéticas y farmacológicas han demostrado que la inhibición de los mecanismos mediados por BDNF (producción insuficiente de BDNF, mutaciones de pérdida de función, o inhibición de la actividad del receptor TrkB) impiden la formación y mantenimiento de la memoria (Montkoski & Holsboer, 1997; Mizuno et al., 2003; Heldt et al., 2007; Petzold et al., 2015), lo cual correlaciona con el déficit de la potenciación de largo plazo como consecuencia de la inhibición o la eliminación del gen de BDNF (Nguyen and Kandel, 1996). Particularmente, el hipocampo es una estructura que requiere la activación de los mecanismos moleculares dependientes de BDNF. La vía de señalización BDNF/TrkB induce LTP en el hipocampo (Korte et al., 1995; Figurov et al., 1996; Kovalchuk et al., 2002; Nicoll and Schmitz, 2005; Meis et al., 2012), sugiriendo la relevancia de la proteína BDNF en el aprendizaje y la memoria espacial. En este sentido, se ha reportado que la vía de señalización TrkB/PI3 (fosfatidilinositol-3-cinasa) se activa en el hipocampo, asociado con la consolidación de la memoria espacial (Yamada y Nabeshima, 2003). De igual manera, la activación de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) dependiente de BDNF es necesaria para la adquisición de la memoria de miedo contextual (Ou y Gean, 2006; Ou y Gean, 2007).

## 1.8 Sinapsina

La familia de proteínas presinápticas conocidas como sinapsinas consta de sinapsina I, II y III, y las formas I y II se expresan principalmente en neuronas. La sinapsina I está involucrada en la elongación del axón y la regulación de la fusión vesicular, mientras que la sinapsina II también se asocia con la elongación del axón y la formación de sinapsis (Ferreira et al., 1995). La función principal de las sinapsinas es mantener unidas las vesículas sinápticas al citoesqueleto. Cuando la sinapsina se fosforila, permite que las vesículas estén disponibles para su liberación, lo que ha llevado a establecer que la sinapsina juega un papel en la reserva de vesículas. La función de la sinapsina in vivo está regulada por diversas vías de fosforilación dependientes de la actividad. Entre las proteínas que regulan la sinapsina se encuentran la proteína quinasa A (PKA), la quinasa activada por mitógenos (MAPK), la tirosina quinasa Src y la Ca<sup>2+</sup>/calmodulina proteína cinasa II (CaMK II) (Schiebler et al., 1986; Llinás et al., 1991; Valtorta et al., 1992).

Investigaciones en *Aplysia* y en células del hipocampo han demostrado que la fosforilación y movilización de las vesículas de sinapsina dependen de la actividad y están controladas por PKA, MAPK y CaMK II (Angers et al., 2002; Chi et al., 2003). Además, se ha observado un control bidireccional de la fosforilación/desfosforilación, con la entrada de Ca<sup>2+</sup> estimulando la fosforilación de sinapsina en sitios dependientes de CaMK II y PKA, mientras que la desfosforilación ocurre en sitios dependientes de MAPK/calcineurina (Jovanovic et al., 2001). Por lo tanto, la interacción de la sinapsina con las vesículas y su movilización están controladas por un ciclo de fosforilación/desfosforilación complejo, dinámico y dependiente de la actividad que está altamente regulado en múltiples sitios (Bykhovskaia, 2011). Esta complejidad en la regulación de la sinapsina sugiere que desempeña un papel crucial en la modulación de la liberación de neurotransmisores y en la plasticidad sináptica, contribuyendo a la funcionalidad y plasticidad de las sinapsis neuronales.

## 1.9 BDNF y sinapsina: dos proteínas asociadas a la memoria espacial

La plasticidad sináptica requiere el remodelamiento de la arquitectura sináptica, dando lugar a la generación de nuevas conexiones neuronales o a la modificación de las conexiones neuronales previamente existentes, lo que finalmente permite el almacenamiento de la memoria a través de la síntesis *de novo* de proteínas (Squire et al., 2015). Una de las proteínas más estudiadas en la modulación de la plasticidad sináptica que se correlaciona con la memoria espacial es el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas

en inglés). En este sentido, se ha reportado que un incremento rápido y transitorio en la expresión de mRNA de BDNF en el hipocampo y la activación del receptor tirosina cinasa B (TrkB) permite la adquisición y consolidación de la memoria espacial (Yamada et al., 2003). De hecho, se ha reportado que, en humanos, un polimorfismo del gen *bdnf* disminuye los niveles de actividad de la proteína BDNF, afectando la memoria episódica y la función hipocampal (Egan et al., 2003; Cheng et al., 2011). También, mediante aproximaciones farmacológicas y genéticas, se ha sugerido que la activación de la vía BDNF/TrkB dependiente de los receptores NMDA controla la inducción y el mantenimiento de la LTP en el hipocampo (Figurov et al., 1996; Zakharenko et al., 2003; Santi et al., 2006). Algunas de las proteínas que participan en la plasticidad neuronal y son moduladas por BDNF son: sinapsina I, la proteína 43 asociada al crecimiento (GAP-43) y la proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico (CREB). La proteína sinapsina I actúa como una proteína intermediaria de la función de BDNF, la cual fosforila a sinapsina I a través del receptor TrkB, lo cual permite su acción moduladora de la neurotransmisión (Thiel, 1993; Meng et al., 2022), a través del control de la fusión y exocitosis de las vesículas sinápticas, el crecimiento axonal y el mantenimiento de las sinapsis (Baekelandt et al., 1994; Jovanovic et al., 2000; Molteni et al., 2002). Por lo tanto, la capacidad de BDNF para modular y controlar la transmisión sináptica y consecuentemente los procesos de aprendizaje y memoria dependen en gran medida de la activación de la proteína sinapsina I a través de los receptores TrkB presinápticos (Resende et al., 2012). Como consecuencia del aprendizaje en modelos de memoria espacial, se ha observado un aumento en la expresión de sinapsina I, lo que sugiere que esta proteína puede estar involucrada en la modulación de la transmisión sináptica y en la regulación de la comunicación entre las neuronas que participan en la formación de la memoria espacial (Gómez-Pinilla y Kesslak, 2001; Shih et al., 2013; Bechara et al., 2013).

## 2. JUSTIFICACIÓN Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Muchos estudios de la neurobiología del aprendizaje y la memoria asumen que estos procesos son dependientes de los cambios en la fortaleza sináptica como consecuencia de la entrada de información sensorial proveniente del medio ambiente (Castellucci et al., 1978; Bliss & Lomo, 1973; Yasuda et al., 2022). En este sentido, las modificaciones postraduccionales de las proteínas son reguladores claves de las vías de señalización implicadas en la plasticidad sináptica (Carmichael & Henley, 2018; Corti & Duarte, 2023) y la síntesis de proteínas (Sun et al., 2021). Se ha reportado que la palmitoilación de proteínas está involucrada en el desarrollo neuronal, la regulación de la neurotransmisión y la plasticidad sináptica en el sistema nervioso central, al influir en la movilización, localización y compartimentación de proteínas (Ji & Skup, 2021). Por lo tanto, la palmitoilación de proteínas emerge como una modificación postraducciona que permite, de manera reversible y dinámica, regular la localización y función de proteínas, proceso esencial para los procesos de aprendizaje y memoria.

El estudio de la palmitoilación de proteínas se ha centrado en procesos relacionados con la plasticidad sináptica (Sohn & Park, 2019; Matt & cols., 2019; Hayashi, 2020; Thomas y Haganir, 2013; Ji & Skup, 2021), un proceso involucrado en la memoria. Sin embargo, la memoria se evalúa a través de un cambio conductual en el sujeto (Abel & Lattal, 2001). Aunque algunos estudios reportan la participación de la palmitoilación en la memoria, las estrategias experimentales utilizadas no permiten conocer las etapas de la memoria en las que la palmitoilación de proteínas es requerida (Brigidi et al., 2014; Spinelli et al., 2017; Oota-Ishigaki et al., 2022). Algo de suma importancia debido a que se necesita que exista una serie de eventos celulares y moleculares de forma temporalmente ordenada para que la memoria se establezca. Por tanto, en este trabajo, se estudió la participación de la palmitoilación de proteínas en los mecanismos celulares relacionados con la memoria utilizando enfoques farmacológicos, electrofisiológicos y bioquímicos. Para ello, se inhibió farmacológicamente la actividad de las enzimas PATS durante la adquisición, consolidación y evocación de la memoria espacial. Además, se evaluó los efectos de la inhibición de las enzimas PATS en la plasticidad sináptica y la síntesis de proteínas en el hipocampo dorsal de ratas.

Este estudio tuvo como objetivo comprender cómo la palmitoilación de proteínas influye en los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a la memoria, permitiendo la identificación de potenciales dianas terapéuticas asociadas a enfermedades neurodegenerativas.

### **3. HIPÓTESIS**

La palmitoilación de proteínas regula la función y localización de proteínas, un mecanismo clave para los procesos de plasticidad sináptica y síntesis de proteínas. Por lo tanto, la palmitoilación de proteínas es necesaria para la adquisición, consolidación y evocación de la memoria espacial en el hipocampo.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Estudiar el efecto de la actividad de las enzimas PATs en la formación y mantenimiento de la memoria espacial, la plasticidad sináptica y síntesis de proteínas en el hipocampo dorsal de rata.

#### **4.1 Objetivos particulares**

- Determinar el efecto de la inhibición de las enzimas PATs antes y después del aprendizaje espacial en las tareas conductuales: laberinto acuático de Morris y localización de objetos.
- Determinar el efecto de la inhibición de las enzimas PATs sobre la plasticidad sináptica y la comunicación neuronal en un modelo de potenciación de largo plazo, comunicación basal y de pulsos pareados.
- Determinar el efecto de la inhibición de las enzimas PATs sobre la expresión de las proteínas sinapsina y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) que son proteínas involucradas con los procesos de aprendizaje y memoria.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Sujetos experimentales**

Los sujetos de experimentación fueron ratas macho (n=215) de la cepa Wistar de dos meses de edad, con un peso aproximado de 250 g al inicio de los experimentos. Los grupos experimentales fueron animales administrados con 2-bromopalmitato o vehículo, manipulados farmacológicamente en diferentes tiempos en protocolos conductuales y electrofisiológicos y para cuantificación de proteínas, cuyas descripciones detalladas serán abordadas más adelante. Las ratas provinieron del bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las ratas se alojaron individualmente en cajas de acrílico transparentes con alimento y agua disponibles *ad libitum*, con ciclo luz/oscuridad de 12/12 h, temperatura de  $22 \pm 2$  °C, y humedad relativa de  $50 \pm 5\%$ . Las tareas conductuales se llevaron a cabo durante la fase de luz del ciclo. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales del Instituto de Fisiología Celular (FBR125-18) y cumplieron con las pautas establecidas en la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

### **5.2 Cirugía estereotáxica**

Las ratas fueron anestesiadas con xilacina a una dosis de 15 mg/Kg y ketamina a una dosis de 70 mg/Kg. La cabeza de las ratas fue inmovilizada en un estereotáxico (Stoelting Company Wood Dale) y el cráneo fue expuesto para la posterior implantación de cánulas guía 23G de acero inoxidable (Small Parts, USA) de 10 mm de longitud. Se realizaron canulaciones bilaterales en el hipocampo dorsal de acuerdo con el atlas del cerebro de rata (Paxinos & Watson, 1996). Las coordenadas de canulación fueron: AP: -3.6, ML: +/- 3.0, DV: -1.3. Las cánulas fueron implantadas en el cráneo de las ratas con cemento dental. Se colocaron agujas dentro de las cánulas implantadas durante la cirugía, con el objetivo de evitar que las cánulas se taparan posteriormente. El tiempo de recuperación post- operatorio fue de 10 días. Después, se iniciaron los experimentos conductuales.

### **5.3 Administración farmacológica intra hipocampal**

El 2-bromopalmitato, inhibidor de las enzimas PATs, fue almacenado a -20 °C. La solución vehículo se preparó disolviendo DMSO (Sigma-Aldrich, No de producto 472301) al 5% en solución salina isotónica (SSI, NaCl 0.9%). El 2-bromopalmitato, se preparó diluyendo 0.1 g de ácido 2-bromohexadecanoico (Sigma-Aldrich, No. producto 238422) en 1 ml de DMSO (solución madre). Las alícuotas de la solución madre se almacenaron a -70 °C durante un máximo de 2 meses. De esta solución madre se tomaron 10 ul y se adicionaron 237.52 ul de DMSO (Solución Final). Al inicio de cada experimento se tomaron 5 ul de la solución final, a

los cuales se le adicionaron 95.33 ul de SSI, obteniendo una solución de 600 uM de 2-bromopalmitato en DMSO 5%. Las soluciones fueron almacenadas a -20 °C.

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 (Laboratorios Zizine) 30 G de 12 mm de longitud. Las agujas fueron insertadas dentro de las cánulas guía, previamente implantadas en el cerebro de las ratas. Cada aguja estaba conectada a una jeringa Hamilton de 10 ul, cuyo émbolo estaba controlado por una bomba de inyección (Cole Parmer, serie 74900). Se administró un volumen de 1 ul en cada hemisferio a un flujo de 0.25 ul/min. Las administraciones intrahipocampales del inhibidor 2-bromopalmitato o el vehículo se realizaron en diferentes momentos dependiendo el protocolo experimental. En los experimentos conductuales, las inyecciones intrahipocampales se realizaron 15 minutos antes del inicio de las adquisiciones, inmediatamente después de la adquisición o 15 minutos antes del inicio de la prueba de memoria.

#### **5.4 Laberinto acuático de Morris (MWM)**

El laberinto acuático de Morris (MWM) es una tarea conductual que evalúa el aprendizaje y la memoria espacial de roedores. Este modelo conductual, consiste en la utilización de señales espaciales distales para que desde una ubicación de inicio alrededor del perímetro de una arena de natación abierta, los animales puedan identificar la ubicación de una plataforma de escape sumergida en el agua (Vorhees & Williams, 2014). La tarea conductual de MWM se realizó en una piscina circular (170 cm de diámetro) con fondo negro, donde se localizaba una plataforma (15 cm x15 cm x 40 cm) de escape en posición fija 2 cm por debajo del nivel de agua para no ser visible por las ratas. La piscina se dividió en cuatro partes iguales. Las claves espaciales internas utilizadas fueron dos figuras geométricas un círculo y un cuadrado color blanco, los cuales se ubicaron en las paredes de dos cuadrantes opuestos. En el cuadrante objetivo se encontraba la plataforma de escape. Mientras que el cuadrante opuesto estaba 180° con respecto a la línea que se forma entre el cuadrante objetivo y el centro de la piscina. Se colocó una cámara de vídeo por encima de la piscina para registrar los ensayos con el software Debut Video Capture-NCH versión 5.73. Las ratas fueron manipuladas tres días antes del entrenamiento, la manipulación fue de manera consecutiva durante 3 minutos con el objetivo de reducir el nivel de estrés.

Durante la adquisición de la tarea, las ratas realizaron 10 ensayos de entrenamiento. Las ratas se colocaron desde una de las 10 posiciones iniciales previamente establecidas por cada ensayo, el experimentador siempre se posicionó en el mismo lugar debido a que también

fue una clave espacial. Se permitió a las ratas nadar y llegar a la plataforma de escape durante un tiempo limitado de 60 segundos. El tiempo se registró como latencia de llegada a la plataforma que estaba oculta en el agua. Si durante el tiempo total de 60 segundos las ratas no lograban encontrar la plataforma, el experimentador las guiaba hasta el lugar. Una vez que las ratas llegaban a la plataforma permanecían ahí durante 30 segundos. Después de terminar el ensayo, cada rata fue colocada en una caja abierta durante 30 segundos, permitiendo el descanso durante este tiempo. Posteriormente, regresaban a la piscina para iniciar el siguiente ensayo. La prueba de memoria a largo plazo (LTM) se realizó 24 horas después de la sesión de entrenamiento. Durante la prueba de LTM, se retiró la plataforma de escape de la piscina, se permitió a las ratas nadar y llegar a la plataforma de escape durante un tiempo limitado de 60 segundos. Durante la tarea conductual del laberinto acuático de Morris, se usaron los grupos 2-bromopalmitato (n=6) y vehículo (n=6) administrados antes de la adquisición; los grupos 2-bromopalmitato (n=6) y vehículo (n=6) administrados después de la adquisición y los grupos 2-bromopalmitato (n=6) y vehículo (n=6) en la evocación. Las ratas regresaron a su caja hogar después del último ensayo. Los registros de video se analizaron para determinar los siguientes parámetros: tiempo de llegada a la plataforma, número de cruces en la plataforma y tiempo en cuadrante objetivo y opuesto.

### **5.5 Memoria de localización de objetos (OLM)**

La memoria de localización de objetos (OLM) es un paradigma conductual que evalúa la memoria espacial de los roedores, debido a su tendencia a explorar por más tiempo la posición novedosa que la posición familiar de un objeto. La tarea conductual se realizó en un campo abierto en una caja de madera (40x40x40 cm) color gris, la cual estaba recubierta con una capa fina de aserrín, una pared de la caja tenía un rectángulo con rayas blancas y negras que sirvió como clave espacial. Los objetos para discriminar fueron un foco (3x3x10 cm) y un frasco (3x3x6 cm). Se colocó una cámara de vídeo arriba de la caja para registrar los ensayos con el software Debut Video Capture-NCH versión 5.73.

Las ratas fueron habitadas durante 5 minutos en la caja sin ningún objeto, tres días consecutivos. Durante la fase de adquisición, las ratas exploraron durante 5 minutos un foco y un frasco ubicados en posiciones específicas. Para evaluar la memoria de corto plazo (STM) 90 minutos después de la adquisición, se movió uno de los objetos a una posición nueva para permitir que las ratas explorarán durante 5 minutos. 24 horas después de la adquisición, en otro grupo de ratas se evaluó la memoria de largo plazo (LTM) que consistió en permitir la exploración durante 5 minutos de la posición novedosa de uno de los objetos previamente presentados. La posición novedosa y familiar de los objetos siempre estuvo contrabalanceada para evitar preferencia por alguno de ellos. Las cajas y los objetos fueron desodorizados con



etanol al 70%, también se cambió la cama de aserrín entre cada ensayo. Las sesiones fueron grabadas y analizadas posteriormente, en las cuales se cuantificó el tiempo total de exploración para cada objeto. Durante la tarea de localización de objetos, se usaron los grupo 2-bromopalmitato (n=7) y vehículo (n=6) para la evaluación de memoria de corto plazo; los grupos 2-bromopalmitato (n=6) y vehículo (n=7) administrados antes del entrenamiento para la evaluación de la memoria de largo plazo; los grupos 2-bromopalmitato (n=6) y vehículo (n=6) administrados después del entrenamiento para la evaluación de la memoria de corto plazo; los grupos 2-bromopalmitato (n=6) y vehículo (n=6) administrados después del entrenamiento para la evaluación de la memoria de largo plazo y los grupos 2-bromopalmitato (n=6) y vehículo (n=6) administrados antes de la prueba de largo plazo. El índice de reconocimiento de objetos se calculó dividiendo el tiempo de exploración para el objeto en posición novedosa o familiar entre el tiempo total de exploración para ambos objetos. El índice de reconocimiento de las ratas debía ser cercano a 0.5 durante la adquisición de la tarea para que no presenten preferencia por algún objeto y fueran incluidas en el análisis estadístico.

### **5.6 Memoria de reconocimiento de objetos (ORM)**

La memoria de reconocimiento de objetos (ORM) es un modelo conductual que 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). La tarea conductual se realizó en un campo abierto en una caja de madera (40x40x40 cm) color gris, la cual estaba recubierta con una capa fina de aserrín, una pared de la caja tenía un rectángulo con rayas blancas y negras que sirvió como clave espacial. Los objetos para discriminar fueron un foco (3x3x10 cm) y un frasco (3x3x6 cm). Se colocó una cámara de vídeo arriba de la caja para registrar los ensayos con el software Debut Video Capture-NCH versión 5.73. Las ratas fueron habitadas durante 5 minutos en la caja sin ningún objeto por tres días consecutivos. Durante la fase de adquisición, las ratas exploraron durante 5 minutos dos objetos idénticos ubicados en posiciones específicas. 24 horas después de la adquisición, se evaluó la memoria de largo plazo (LTM) en la cual uno de los objetos es cambiado por un objeto nuevo sin cambiar su ubicación previamente presentada. El objeto novedoso y familiar siempre estuvo contrabalanceado para evitar preferencia por alguno de ellos. Las cajas y los objetos fueron desodorizados con etanol al 70%, también se cambió la cama de aserrín entre cada ensayo. Durante la tarea de reconocimiento de objetos, se usaron los grupos 2-bromopalmitato (n=5) y vehículo (n=5) administrados después del entrenamiento.

Las sesiones fueron grabadas y analizadas posteriormente, en las cuales se cuantificó el tiempo total de exploración para cada objeto. El índice de reconocimiento de objetos se calculó dividiendo el tiempo de exploración para el objeto nuevo o familiar entre el tiempo total de exploración para ambos objetos. El índice de reconocimiento de las ratas debía ser cercano a 0.5 durante la adquisición de la tarea para que no presentaran preferencia por algún objeto y fueran incluidas en el análisis estadístico.

### **5.7 Registros electrofisiológicos**

Las ratas fueron anestesiadas por vía intraperitoneal con pentobarbital sódico a una dosis de 20 mg/kg de peso y una inyección intramuscular de xilazina a una dosis de 15 mg/kg de peso. La dosis de mantenimiento con pentobarbital sódico fue de 10 mg/kg de peso y se administró 60 minutos después de la anestesia inicial. Una vez anestesiadas, las ratas se colocaron en un aparato estereotáxico (51603, Stoelting). Se ajustó la posición de la cabeza al plano horizontal, se hizo una incisión en la piel para exponer el cráneo y posteriormente un trépano unilateral para implantar el electrodo de estimulación bipolar concéntrico de acero inoxidable ubicado en la región CA3 del hipocampo (desde bregma, AP: -2,2 mm; ML: -2,0 mm; DV: -1,5 mm). Las respuestas unilaterales se registraron con un electrodo monopolar de acero inoxidable ubicado en la región CA1 del hipocampo (desde bregma, AP: -2,0 mm; ML: -1,4 mm; DV: -1,5 mm). Se proporcionó una estimulación de corriente constante de 0.2 mV a través de un estimulador Grass S48 y se entregó al electrodo de estimulación a través de una Unidad de aislamiento de estímulo Grass (PSUI6). Las respuestas evocadas se enviaron a un amplificador Grass P5. La señal eléctrica se digitalizó, almacenó y analizó utilizando el software Datawave SciWorks (Broomfield, CO, EE. UU.).

- Curvas de entrada/salida (E/S). Las curvas de E/S se generaron mediante la variación sistemática de la corriente de estímulo (1x–10x) para determinar la eficiencia sináptica basal. La relación entre la corriente de entrada y el voltaje de salida se midió en el CA3-CA1 del hipocampo. La intensidad basal se determinó como la estimulación mínima necesaria para provocar una respuesta de 0.2 mV.
- Potenciación a largo plazo. Después de que se estableciera una línea basal de respuesta provocada eléctricamente durante 15 min con una intensidad de estímulo correspondiente al 50% de la amplitud máxima del EPSP, se inició un protocolo de LTP entregando cuatro trenes de estimulación (1 s, 100 Hz) con 20 s de tiempo entre trenes. Las respuestas evocadas posteriores a la estimulación se registraron durante 1 hora. La potenciación a largo plazo se calculó por el porcentaje del cambio de la

amplitud de la respuesta evocada en comparación con la línea de base. Para analizar el efecto de la inhibición de las enzimas PATs sobre la potenciación a largo plazo, se evaluaron cuatro grupos: grupos de vehículo (n=10) y 2-bromopalmitato (n=10) inyectados 15 min antes de la inducción de LTP, y grupos de vehículo (n=7) y 2-bromopalmitato (n=7) inyectados 15 min después de la inducción de LTP.

## **5.8 Extracción y cuantificación de proteínas**

Para la cuantificación de proteínas por Western Blot, se usaron los grupos control (n=12), vehículo (n=10) y 2-bromopalmitato (n=10). Las ratas fueron decapitadas 4 horas después del entrenamiento, el cerebro fue rápidamente extraído del cráneo y se disectó el hipocampo dorsal en condiciones frías. El tejido fue colectado en microtubos de 1.5 ml y se adicionaron 100ul de buffer de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% tritón X-100, 0.5% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 50 mM NaF, 1 mM ortovanadato de sodio, inhibidores de proteasas cOMplete ULTRA Tabl., Roche) por cada 5 mg de tejido. Luego de 5 minutos, se procedió a la desintegración del tejido mediante sonicación (Branson Sonifer 250) con los siguientes parámetros: temporizador: sostenido; ciclo: 50%; control de salida: micro tip limit; límite de sonicated: 8 ciclos. Las muestras desintegradas se mantuvieron en hielo y en agitación constante por 15 minutos, para luego ser centrifugadas a 12500 rpm por 20 minutos a 4 °C, recuperándose el sobrenadante en microtubos nuevos y guardados a -80C° hasta su uso.

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método de Bradford, por lo que se utilizó el reactivo de Bradford comercial (Biorad, 500-0006) cuya sensibilidad y linealidad varía de 0.05mg/ml hasta 0.5mg/ml. Se preparó una solución estándar de albúmina de suero bovino (Santa Cruz, #) de 1.6mg/ml diluido en solución amortiguadora de lisis RIPA para una concentración final de 0.25ug/ul. El reactivo de Bradford se diluyó 1:5 en agua bidestilada, con posterior filtrado para eliminar precipitados. Con la solución patrón de BSA se realizó una curva de absorbancia a diferentes concentraciones en un rango de 0.0125 ug/ul hasta 0.2250 ug/ul. Las muestras se diluyeron 1:50 en agua miliQ y se tomaron 10 ul para hacerlos reaccionar con 200 ul del reactivo de Bradford diluido, se realizó por triplicado. Se dejó incubar por 5 min y se realizó la lectura en lector de microplacas con un filtro de 630 nm. La concentración de las muestras se obtuvo por regresión lineal e interpolación considerando el factor de dilución empleado.

## 5.9 Electroforesis e inmunoblot

A cada uno de los extractos de proteína se les adicionó buffer Laemmli 2x en una relación 1:1 y fueron desnaturalizadas a 97°C por 5 minutos, luego de los cuales se sumergieron en hielo por 5 minutos. En un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 7% se cargó el volumen correspondiente a 10 µg de proteína total de cada una de las muestras. La electroforesis se llevó a cabo a 80V durante dos horas y media. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF de 0.45 µm a 25V por 45 minutos en cámara de transferencia húmeda, previo lavado del gel en solución amortiguadora de transferencia por 15 minutos y activación de la membrana de PVDF en metanol por 1 minuto. Luego de la transferencia, las membranas se dejaron secar a temperatura ambiente cubiertas con papel filtro (Whatman<sup>R</sup>) por una hora, luego de las cuales se reactivaron con metanol, y se realizaron 3 lavados, de 5 minutos cada uno, en solución TBS (150 mM NaCl, 100 mM Tris base), seguido de bloqueo de la membrana con albúmina de suero bovino al 5% en TBST (TBS adicionado con Triton X-100 0.1%) por una hora y media. Las membranas fueron incubadas una noche a 4 °C los anticuerpos anti-BDNF (ratón, 1:250, Millipore, #), anti-Sinapsina o anti-GAPDH. Los anticuerpos fueron diluidos en TBST con albúmina de suero bovino al 3%. Las membranas se lavaron por 3 veces durante 5 minutos en solución TBST, y se incubaron por una hora con anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano: Anti-ratón (cabra, 1:5000, Zimed, #). Al término de la incubación, las membranas se lavaron 6 veces por 5 minutos con TBST. El revelado se realizó mediante la reacción quimioluminiscente usando Luminol y peróxido de hidrógeno como sustratos de la peroxidasa de rábano (Immobilon<sup>TM</sup> Western chemiluminescent HRP substrate, WBKLS, Millipore). La luminiscencia fue detectada en un fotodocumentador (Li-cor, Modelo 3600) durante 12 minutos. Se eligieron las imágenes con menor ruido de fondo y mayor definición de bandas. El análisis densitométrico fue realizado utilizando el software Image-J (NIH, Bethesda). Las densidades de BDNF (en el inmunoblot se observaron principalmente dos bandas, la banda elegida corresponde al BDNF maduro aproximadamente de 14 kDa), de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, única banda de aproximadamente 35 kDa) y de sinapsina (banda de aproximadamente de 43 kDa) fueron obtenidas por la cuantificación del porcentaje del área ocupada por la banda. Las expresiones relativas fueron calculadas por el cociente de la densidad de BDNF o sinapsina y la densidad de GAPDH todas ajustadas al control.

### **5.10 Tinción de Nissl**

Para determinar el sitio de administración del inhibidor 2-bromopalmitato y del vehículo, las ratas (n=50) fueron sacrificadas y perfundidas 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  $\mu$ m de ancho en el criostato (Leica CM1520) a -20 °C. Los cortes se recuperaron y almacenaron en solución TBS. Los cortes de interés fueron montados en portaobjetos gelatinizados y se dejaron secar durante 24 horas luego de los cuales se llevó a cabo la tinción de Nissl. Los cortes cerebrales fueron hidratados en concentraciones decrecientes de etanol desde etanol 90% hasta agua destilada. Los cortes fueron sumergidos en acetato de violeta de cresilo (violeta de cresilo al 0.5%, ácido acético glacial al 0.3%, en agua destilada) durante 2 min. El exceso de colorante fue lavado con agua destilada; se continuó con inmersiones en etanol al 50% durante 1 min. Posteriormente los cortes fueron lavados con etanol ácido (ácido acético glacial al 1% en etanol al 70%) durante 2 min. Finalmente, los cortes coronales fueron deshidratados y montados con resina sintética (Hycel, 7987-500).

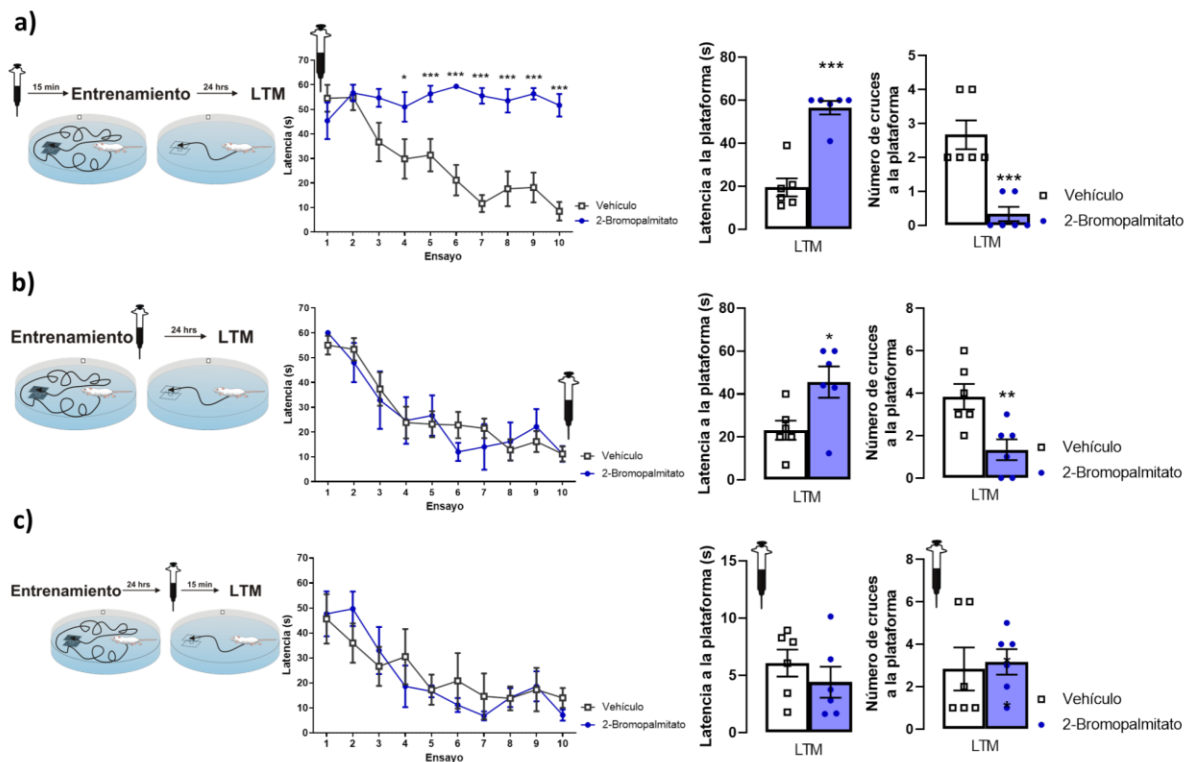
### **5.11 Análisis de datos**

Los datos se analizaron usando el software GraphPad Prism versión 8.0. Se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnoff para determinar la distribución. Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM. Las pruebas estadísticas elegidas para el análisis fueron: prueba t de Student de dos colas, ANOVA de dos vías post-hoc Bonferroni para el análisis conductual. El análisis de los inmunoblots se realizó usando ANOVA de una vía post-hoc Tukey. En todos los análisis estadísticos se consideró estadísticamente significativo una  $p < 0.05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1 La adquisición y la consolidación de la memoria espacial en el MWM depende de la actividad de las enzimas PATs.

Se determinó la participación de la palmitoilación en el aprendizaje y la memoria espacial durante las fases de adquisición, consolidación y evocación del laberinto acuático de Morris (MWM), un modelo de memoria espacial en roedores. A las ratas se les administró 2-bromopalmitato, que es un inhibidor irreversible que se une covalentemente al sitio activo de las enzimas PATs (Davda et al., 2013), mediante administración intrahipocampal bilateral. La fase de adquisición consistió en diez sesiones de entrenamiento y la prueba de memoria a largo plazo se evaluó 24 horas después durante una única sesión de 1 minuto. La Figura 1a muestra que las ratas a las que se administró el 2-bromopalmitato antes de la adquisición, pasaron más tiempo buscando la plataforma oculta a diferencia del grupo vehículo durante el entrenamiento. En consecuencia, durante la prueba de memoria a largo plazo (LTM), el grupo 2-bromopalmitato tuvo una mayor latencia de llegada a la plataforma y un menor número de cruces al área de la plataforma oculta, lo que indica una menor ejecución de la LTM comparado con el grupo vehículo. Con el fin de diferenciar si el efecto del 2-bromopalmitato afectaba la adquisición o consolidación de la memoria, administramos 2-bromopalmitato o vehículo inmediatamente después de la última sesión de entrenamiento. Observamos que, aunque ambos grupos aprendieron la posición espacial de la plataforma oculta, el grupo de 2-bromopalmitato tuvo una mayor latencia de llegada a la plataforma y un menor número de cruces al área de la plataforma oculta durante la LTM (Figura 1b). Finalmente, para evaluar el efecto de la administración del inhibidor 2-bromoapalmitato en la evocación de la memoria espacial, administramos 2-bromopalmitato 15 minutos antes de la LTM en ratas entrenadas. La administración del inhibidor 2-bromopalmitato no afectó la latencia y el número de cruces al área de la plataforma oculta (Figura 1c). Estos hallazgos sugieren que la actividad de las enzimas PATs es necesaria para aprender y consolidar la memoria espacial en la tarea de MWM, pero no es necesaria para la evocación de la tarea de MWM.



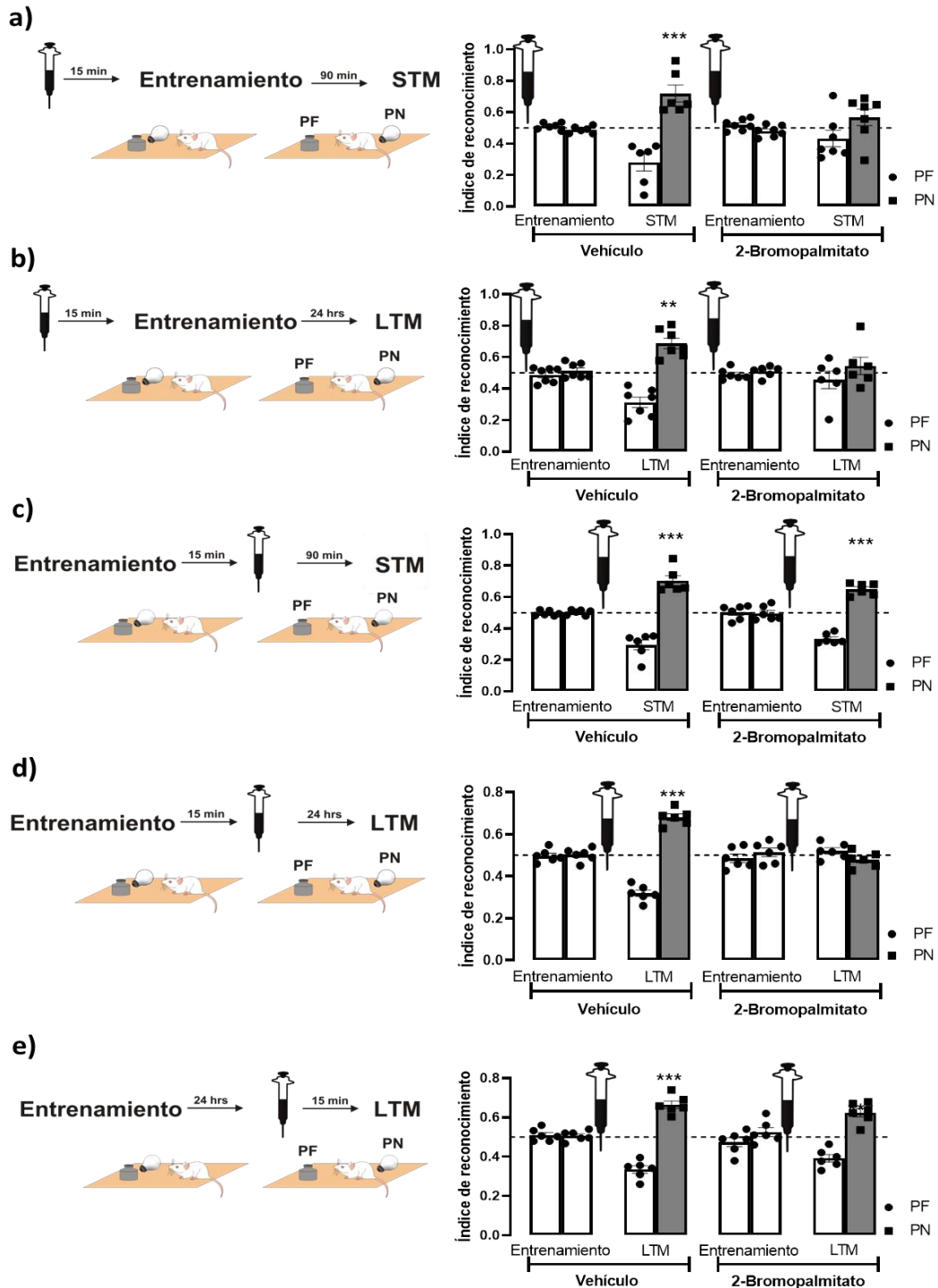
**Figura 1. La inhibición de las enzimas PATs impide la adquisición y la consolidación, pero no la evocación de la memoria la espacial en el laberinto acuático de Morris.** **a)** El grupo 2-bromopalmitato ( $n=6$ ) no disminuyó el tiempo de latencia de llegada a la plataforma con la progresión de los ensayos como ocurrió en el grupo vehículo ( $n=6$ ), impidiendo la adquisición de la memoria (ANOVA de dos vías  $F_{1,10}=35.85$   $P=0.0001$ , Post-hoc Bonferroni  $p<0.0001$ ). Durante la evaluación de la memoria de largo plazo (LTM), 24 horas después del entrenamiento, la latencia de llegada a la plataforma fue mayor en el grupo 2-bromopalmitato vs el grupo vehículo (t de Student no pareado  $P<0.0001$ ) y el número de cruces al lugar de la plataforma fue menor en el grupo 2-bromopalmitato vs el grupo vehículo (t de Student no pareado  $P=0.0006$ ). **b)** El grupo vehículo ( $n=6$ ) y el grupo 2-bromopalmitato ( $n=6$ ) no mostraron diferencias en el aprendizaje espacial a lo largo de los ensayos (ANOVA de dos vías  $F_{1,10}=0.03823$   $P=0.8489$ ). La latencia de llegada al área de la plataforma fue mayor en el grupo 2-Bromopalmitato vs el grupo vehículo (t de Student no pareado  $P=0.0254$ ). El grupo 2-bromopalmitato tuvo un menor número de cruces en el lugar de la plataforma vs el grupo vehículo (t de Student no pareado  $P=0.0093$ ). **c)** Los grupos vehículo ( $n=6$ ) y 2-bromopalmitato ( $n=6$ ) no mostraron diferencias en el aprendizaje espacial a lo largo de los ensayos (ANOVA de dos vías  $F_{1,10}=0.8419$ ,  $P=0.7776$ ). Durante la LTM, la latencia de llegada a la plataforma, así como el número de cruces en el lugar de la plataforma fueron similares en ambos grupos (t de Student no pareado  $P=0.3737$  y  $P=0.7831$ ). Los dibujos de las jeringas indican el momento de las inyecciones intrahipocámpales antes del entrenamiento (15 min), después del entrenamiento y antes de la LTM (15 min). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.0001$ .

## **6.2 La adquisición y consolidación de la memoria de localización de objetos depende de la actividad de las enzimas PATs.**

Ampliamos nuestros resultados evaluando los efectos de la inhibición de las enzimas PATs en un modelo de memoria de localización de objetos (OLM), otra tarea conductual que evalúa la memoria espacial. Una ventaja de la tarea de OLM es que permite evaluar la memoria de corto plazo para discriminar los eventos asociados a la adquisición de la memoria de los eventos asociados a la consolidación de la memoria. Por esta razón, evaluamos el efecto de la administración intrahipocampal de 2-bromopalmitato en la memoria de corto y largo plazo de OLM en ratas. En la fase de entrenamiento, se permitió a las ratas explorar libremente dos objetos idénticos en posiciones específicas durante 5 minutos. Durante la prueba de memoria, la ubicación de uno de los objetos se cambió a una localización nueva. Para determinar el efecto de la inhibición de las enzimas PATs en la fase de entrenamiento, administramos 2-bromopalmitato 15 minutos antes del entrenamiento. Observamos un índice de reconocimiento similar para ambas ubicaciones en el grupo vehículo y el grupo 2-bromopalmitato, sin preferencia de exploración por alguno de los objetos. Durante la prueba de memoria de corto plazo (STM; 90 minutos después del entrenamiento), el grupo vehículo exploró preferencialmente el objeto en posición novedosa frente al objeto en posición familiar. Sin embargo, el grupo de 2-bromopalmitato no discriminó entre el objeto en posición novedosa del objeto en posición familiar (Figura 2a), lo que significa que el aprendizaje de la localización de los objetos se vio afectado. Este mismo efecto se observó en la prueba de memoria de largo plazo (LTM; 24 horas después del entrenamiento) (Figura 2b). Posteriormente, estudiamos el efecto de la inhibición de las enzimas PATs en la consolidación de la memoria de OLM, mediante la administración de 2-bromopalmitato inmediatamente después de la fase de entrenamiento. Durante la evaluación del STM, ambos grupos, 2-bromopalmitato y vehículo, dedicaron más tiempo a explorar el objeto en la nueva ubicación que el objeto en posición familiar (Figura 2c). Estos resultados sugieren que la administración del 2-bromopalmitato no afecta los mecanismos celulares que subyacen a la memoria de corto plazo. Tomando en conjunto los experimentos de evaluación de memoria de corto plazo, se infiere que la administración del inhibidor 2-bromopalmitato impide la adquisición en el OLM cuando se administra antes del entrenamiento, pero no después. Por otro lado, cuando el inhibidor se administra posterior al entrenamiento y se evalúa la LTM, se impide la consolidación del OLM, puesto que el índice de reconocimiento es similar para ambos objetos, mientras que el grupo vehículo prefiere explorar el objeto en la posición novedosa. Además, los resultados mostraron que el 2-bromopalmitato no alteró la actividad motora ya que los tiempos totales de exploración se mantuvieron iguales para ambos grupos (ver tabla 1). Finalmente, la administración del inhibidor 2-bromopalmitato no afectó la LTM cuando el fármaco se administró 15 minutos antes de la prueba, que se realizó 24 h posterior al



entrenamiento (Figura 2e). Por lo tanto, se infiere que la adquisición y consolidación de la memoria espacial depende de la actividad de las enzimas PATs. Sin embargo, una vez establecido el trazo de memoria espacial, las enzimas PATs parecen no participar en los procesos de evocación de la memoria.

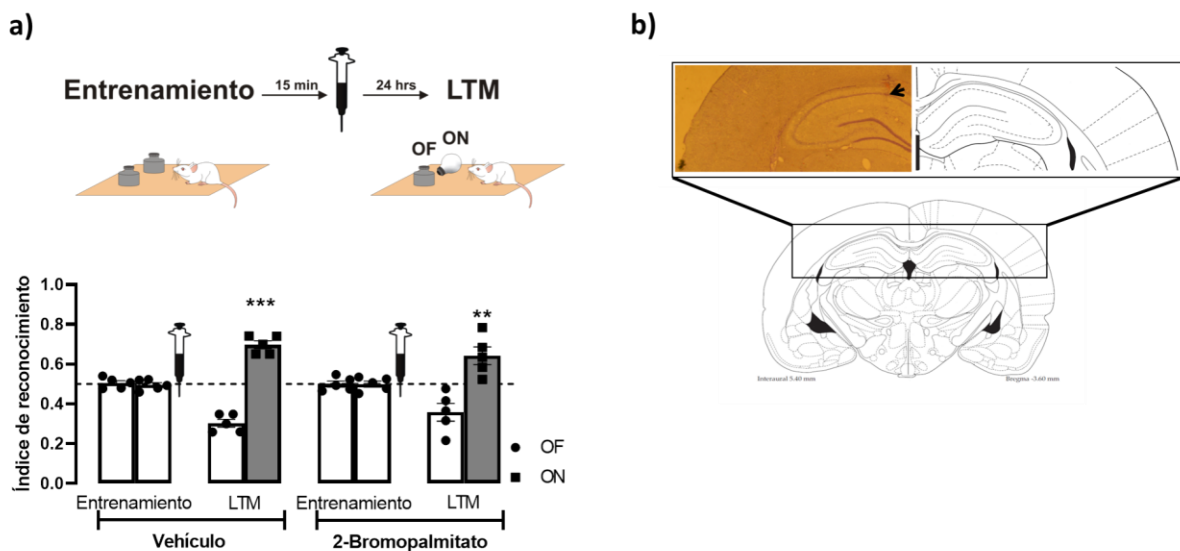


**Figura 2. La inhibición de las enzimas PATs impide la adquisición y consolidación, pero no la evocación de la memoria de localización de objetos.** **a)** El grupo vehículo (n=6) reconoció el objeto en posición novedosa (PN) (t de Student pareado P=0.0002) mientras que el grupo 2-bromopalmitato (n=7) no lo reconoció (t de Student pareado P=0.0948) en la memoria de corto plazo (STM). **b)** El grupo vehículo (n=7) reconoció el objeto en PN (t de Student pareado P<0.0001), mientras que el grupo 2-bromopalmitato (n=6) no logró reconocerlo (t de Student pareado P=0.2820) durante la LTM. **c)** 15 minutos después del entrenamiento se administró 2-bromopalmitato (n=6) o vehículo (n=6) en el hipocampo, ambos grupos reconocieron el objeto en PN (t de Student no pareado, Vehículo P<0,0001, 2-bromopalmitato P<0,0001) durante la STM, mientras que, **d)** en la LTM, el grupo vehículo (n=6) reconoció el objeto en PN (t de Student pareado P <0.0001), y el grupo 2-bromopalmitato (n=6) no discriminó el objeto en PN (t de Student pareado P = 0,0810). **e)** 15 minutos antes de la LTM, las ratas

fueron administradas con 2-bromopalmitato (n=6) o vehículo (n=6) en el hipocampo. Ambos grupos reconocieron el objeto en PN (t de Student pareado, vehículo  $P<0,0001$  y 2-bromopalmitato,  $P<0,0001$ ). La jeringa indica el momento de la administración de 2-bromopalmitato o vehículo en el hipocampo. \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,0001$ .

### 6.3 La inhibición de las enzimas PATs en el hipocampo no afecta la memoria independiente del hipocampo.

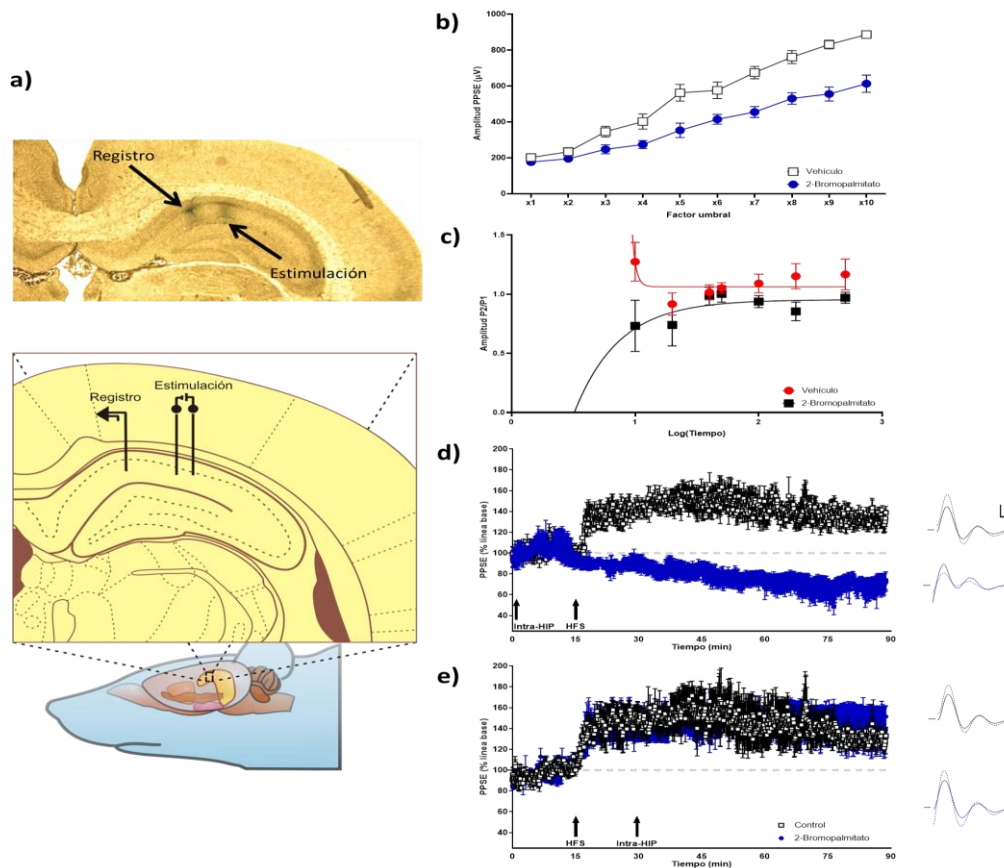
Con el fin de determinar si la inhibición de las enzimas PATs tiene efectos inespecíficos, utilizamos la memoria de reconocimiento de objetos (ORM), una tarea de memoria de reconocimiento independiente del hipocampo (Balderas et al., 2008). Para esto, evaluamos la capacidad de las ratas para reconocer un objeto previamente reconocido como familiar frente a un nuevo objeto, midiendo el tiempo de exploración de ambos objetos. La administración del inhibidor o el vehículo se realizó inmediatamente después de la fase de entrenamiento de ORM en el hipocampo. Los resultados mostraron que ambos grupos, 2-bromopalmitato y vehículo, reconocieron el objeto novedoso durante la prueba de memoria de largo plazo (Figura 3a). Por lo tanto, la administración de 2-bromopalmitato en el hipocampo (Figura 3b) no perjudica el establecimiento de una memoria independiente del hipocampo, como ORM.



**Figura 3. La inhibición de las enzimas PATs en el hipocampo no afecta la memoria independiente del hipocampo. a)** La administración del inhibidor de enzimas PATs, 2-bromopalmitato (n=5) o vehículo (n=5) en el hipocampo se realizó inmediatamente después del entrenamiento. Durante la LTM, ambos grupos reconocieron el objeto novedoso (ON) en comparación con el objeto familiar (OF) (t de Student pareado, vehículo,  $P<0,0001$ , 2-bromopalmitato  $P=0,0019$ ). La jeringa indica el tiempo de la administración de 2-bromopalmitato o vehículo en el hipocampo. **b)** Imagen representativa de la microinyección de 2-bromopalmitato o vehículo en la región CA1 del hipocampo.

#### **6.4 La inducción, pero no el mantenimiento de la potenciación a largo plazo requiere actividad de las enzimas PATs.**

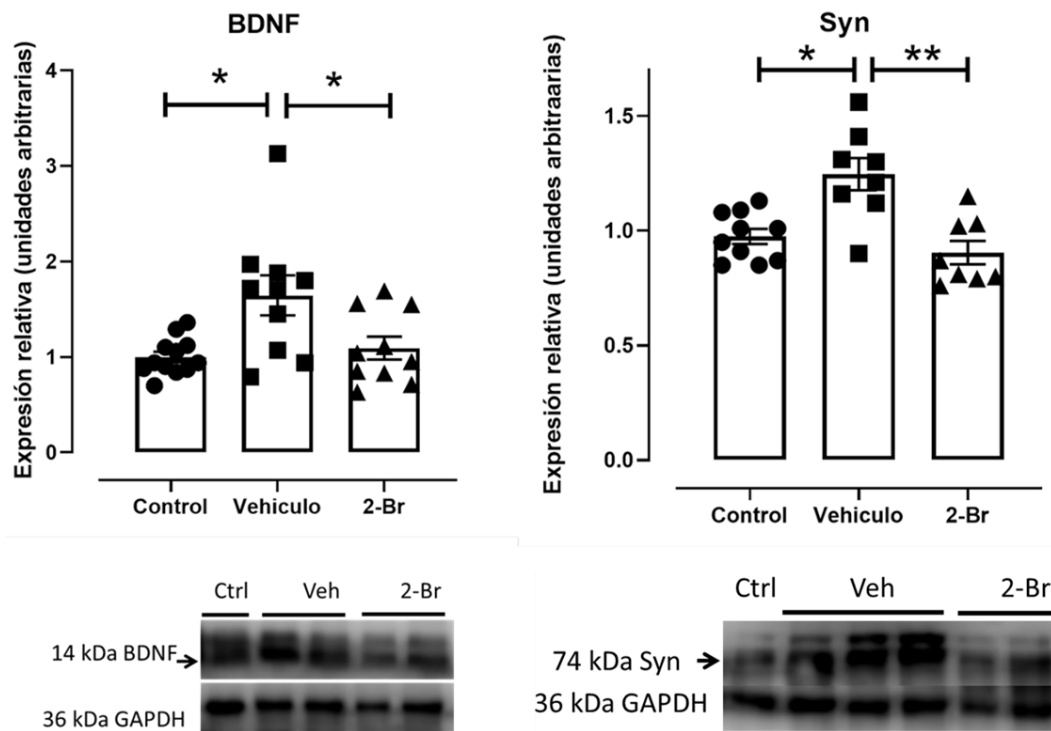
Nuestros resultados muestran que la inhibición de las enzimas PATs interfiere con la adquisición y la consolidación de la memoria espacial, pero la evocación no se ve afectada. Como parte de este trabajo se planteó la hipótesis de que la inhibición de las enzimas PATs alteraría la plasticidad sináptica en un modelo de potenciación de largo plazo (LTP) en la vía de las colaterales de Schaffer, un circuito crítico involucrado en la memoria espacial (Figura 4a). El análisis inicial de las curvas de entrada-salida de corriente en la vía de las colaterales de Schaffer mostró que la inhibición de la actividad de las enzimas PATs 15 minutos antes del registro disminuye la comunicación (Figura 4b). Adicionalmente, en un protocolo de pulsos pareados, se observó que el grupo vehículo presenta una facilitación en la comunicación neuronal, mientras que la inhibición de la actividad de las enzimas PATs impide esta facilitación, observándose una depresión de la comunicación neuronal (Figura 4c). Para determinar si la inhibición de las enzimas PATs altera la LTP, realizamos una estimulación eléctrica de alta frecuencia (HFS) en la vía de las colaterales de Schaffer y registramos la actividad eléctrica en la región CA1 del hipocampo en ratas anestesiadas. Observamos una inducción de la potenciación en el grupo vehículo administrado 15 minutos antes de la HFS. Sin embargo, la administración de 2-bromopalmitato 15 minutos antes de la HFS impidió la inducción de la LTP, e incluso se indujo una depresión (Figura 4d). Por el contrario, la administración de 2-bromopalmitato después de la inducción de la potenciación a largo plazo no altera la respuesta electrofisiológica evocada hasta 60 minutos después, siendo similar a la curva registrada en el grupo vehículo (figura 4d). Nuestros resultados sugieren un papel destacado de la actividad PATs en la comunicación neuronal y la plasticidad sináptica, debido a que su inhibición provoca alteraciones en la facilitación de la vía de las colaterales de Schaffer. Sin embargo, una vez que ocurre la inducción de la plasticidad sináptica, la actividad de las enzimas PATs parece ya no ser requerida.



**Figura 4. La actividad de las enzimas PATs es requerida para la comunicación neuronal y la plasticidad sináptica.** **a)** El electrodo de estimulación se implantó en las colaterales de Schaffer, mientras que el electrodo de registro se implantó en la región CA1. **b)** Curvas de entrada-salida (I/O) para los grupos 2-bromopalmitato (n=15) o vehículo (n=12). El análisis ANOVA bidireccional de la relación I/O muestra diferencias significativas entre los grupos ( $P < 0,0001$ ). La potenciación a largo plazo (LTP) en el hipocampo se realizó bajo anestesia. **c)** Curva de pulsos pareados (n=6 por grupo). El eje X representa el logaritmo del tiempo entre los dos pulsos. El eje Y representa la proporción de la amplitud del segundo pulso (P2) sobre la amplitud del primer pulso (P1). **d)** Una vez estabilizado el registro, se administró vehículo (n=9) o 2-bromopalmitato (n=9) en el hipocampo (intra-HIP) y 15 minutos después se realizó la estimulación de alta frecuencia (HFS) (4 trenes de estímulo, 1 s, 100 Hz, 20 s entre trenes). El grupo vehículo presentó LTP (ANOVA bidireccional  $F_{1,8}=25,22$   $P=0,0007$ , prueba post hoc de Bonferroni  $P=0,0196$ ), mientras que el grupo 2-bromopalmitato muestra una comunicación sináptica deprimida hasta por 90 minutos después de la HFS (ANOVA de dos vías  $F_{1,9}=25,22$   $P=0,0007$ , prueba post hoc de Bonferroni  $P=0,0075$ ). **e)** 15 minutos después de HFS (4 trenes de estímulo, 1 s, 100 Hz, 20 s entre trenes), se realizó una inyección intrahipocámpica (intra-HIP) de vehículo (n=9) o 2-bromopalmitato (n=9). No se observaron diferencias en la LTP hasta los 90 minutos (ANOVA bidireccional, veh  $F_{1,8}=0,5384$   $P=0,5162$ , prueba post hoc de Bonferroni  $P=0,0864$ ; 2-Br  $F_{1,14}=0,5384$   $P=0,5162$ , prueba de Bonferroni prueba post-hoc  $P=0,0683$ ). Las líneas continuas representan el fEPSP antes de HFS y las líneas punteadas representan el fEPSP después de HFS.

### **6.5 La inhibición de las enzimas PATs disminuye la expresión de proteínas involucradas en plasticidad sináptica y la consolidación de la memoria espacial.**

Para describir los posibles mecanismos celulares que pudieran estar alterados como consecuencia de la inhibición de las enzimas PATs, se evaluó la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y sinapsina (Syn), como consecuencia del entrenamiento en el laberinto acuático de Morris y bajo los efectos del inhibidor 2-bromopalmitato. La adquisición de la información espacial como consecuencia del entrenamiento en el laberinto acuático de Morris (MWM) indujo el aumento en la expresión de la proteína BDNF en el grupo vehículo comparado con el grupo control, los cuales nadaron durante 10 sesiones de 1 minuto en ausencia de la plataforma de llegada. Interesantemente, la administración de 2-bromopalmitato antes del entrenamiento disminuyó la expresión de la proteína BDNF al mismo nivel del grupo control (Figura 5a). De igual manera, la expresión de la proteína Syn disminuyó en el grupo tratado con el inhibidor 2-bromopalmitato comparado con las ratas tratadas con el vehículo (Figura 5b). Estos resultados nos permiten concluir que la expresión de proteínas requeridas durante la plasticidad sináptica y la consolidación de la memoria espacial dependen de la actividad de las enzimas PATs. Este resultado sugiere fuertemente que la palmitoilación de proteínas contribuye a la regulación de la expresión de proteínas, que permiten la formación y el mantenimiento de la memoria espacial.



**Figura 5. La inhibición de las enzimas PATs en el hipocampo reduce la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y la sinapsina (Syn).** La inhibición de las enzimas PATs se realizó después del entrenamiento en el laberinto acuático de Morris y 4 horas después, las ratas fueron sacrificadas. **a)** El grupo vehículo (n=10) tuvo una mayor expresión de la proteína BDNF comparado con el grupo control (n=12) (ANOVA de una vía,  $P=0.0047$ , análisis post-hoc de Tukey, Control vs Vehículo, p-value ajustado: 0.0055), mientras el grupo 2-bromopalmitato (2-Br) (n=10) expresó la proteína BDNF al mismo nivel que el grupo control (análisis post-hoc de Tukey, Control vs 2-Br, p-value ajustado: 0.69; vehículo vs 2-Br, p-value ajustado: 0.02). **b)** El grupo vehículo (n=8) tuvo una mayor expresión de la proteína sinapsina comparado con el grupo control (n=10) (ANOVA de una vía,  $P=0.0003$ , análisis post-hoc de Tukey, Control vs Vehículo, p-value ajustado: 0.0025). Por otro lado, el grupo 2-bromopalmitato (2-Br) (n=8) no incrementó la expresión de la proteína, sino que se mantuvo al nivel de expresión del grupo control (análisis post-hoc de Tukey, Control vs 2-Br, p-value ajustado: 0.58; vehículo vs 2-Br, p-value ajustado: 0.0004).

<b>Laberinto acuático de Morris</b>		
	Adquisición(cm/s)	LTM (cm/s)
<b>Antes de entrenamiento</b>		
<i>Vehículo</i>	22.03 ± 1.68	23.46 ± 5.64
<i>2-Bromopalmitato</i>	22.94 ± 0.55	25.42 ± 4.27
<b>Después de entrenamiento</b>		
<i>Vehículo</i>	24.19 ± 1.71	24.36 ± 2.74
<i>2-Bromopalmitato</i>	25.07 ± 1.85	25.78 ± 0.81
<b>Después LTM</b>		
<i>Vehículo</i>	24.53 ± 2.77	26.13 ± 0.75
<i>2-Bromopalmitato</i>	22.22 ± 3.51	21.33 ± 5.67
<b>Memoria de localización de objetos</b>		
	Adquisición(s)	LTM (s)
<b>Antes de entrenamiento</b>		
<i>Vehículo</i>	16.78 ± 3.63	14.37 ± 5.75
<i>2-Bromopalmitato</i>	17.18 ± 8.51	13.55 ± 2.44
<b>Después de entrenamiento</b>		
<i>Vehículo</i>	23.60 ± 5.89	18.28 ± 8.56
<i>2-Bromopalmitato</i>	26.62 ± 5.78	15.31 ± 5.24
<b>Antes LTM</b>		
<i>Vehículo</i>	22.38 ± 2.07	12.57 ± 3.53
<i>2-Bromopalmitato</i>	23.55 ± 7.28	13.97 ± 3.72
<b>Memoria de reconocimiento de objetos</b>		
	Adquisición(s)	LTM (s)
<b>Después de entrenamiento</b>		
<i>Vehículo</i>	15.70 ± 7.69	15.14 ± 7.17
<i>2-Bromopalmitato</i>	17.17 ± 8.51	13.55 ± 2.44

**Tabla 1.** Velocidad de nado y tiempos totales de exploración de objetos en tareas de memoria espacial. Velocidad de nado para los grupos vehículo y 2-bromopalmitato antes del entrenamiento, después del entrenamiento y antes de la memoria a largo plazo (LTM) en el laberinto acuático de Morris (sección 1). Tiempos totales de exploración de objetos en la memoria de localización y memoria de reconocimiento de objetos (secciones 2 y 3). Todos los datos se muestran como media ± SEM.



## 7. DISCUSIÓN

Dado que la participación de las enzimas PATs en los procesos de aprendizaje y memoria aún se comprende de manera limitada, en este trabajo se utilizó una aproximación farmacológica, empleando un inhibidor de las enzimas PATs para revelar el papel funcional de la palmitoilación de proteínas en las fases de la memoria espacial. A pesar de que se ha reportado que el inhibidor 2-bromopalmitato inhibe enzimas relacionadas con el metabolismo de lípidos (Coleman et al., 1992; Quach et al., 2016), los estudios de su cinética de inhibición han demostrado que tiene una afinidad mayor por las enzimas PATs (Zheng et al., 2013), por lo que su uso a bajas concentraciones permite inhibir la actividad de las enzimas PATs sin alterar otros mecanismos celulares, siendo el único inhibidor validado en modelos in vivo e in vitro para inhibir la palmitoilación de proteínas (Lan et al., 2021). Adicionalmente, aun cuando en este trabajo no se evaluó directamente el efecto del 2-bromopalmitato sobre la inhibición de la palmitoilación de las proteínas, ha sido ampliamente reportado su efecto inhibitorio de la palmitoilación de proteínas dependientes de las enzimas PATs (Webb et al., 2000; Jennings et al., 2009; Van-dolah et al., 2011; Davda et al., 2013; Mukai et al., 2016) por lo que en este trabajo, el efecto del 2-bromopalmitato como inhibidor de las enzimas PATs se presume bonafide.

### *La adquisición de la información espacial requiere de la palmitoilación de proteínas*

La inhibición de las enzimas PATs durante el entrenamiento, es decir durante la fase de adquisición del laberinto acuático de Morris (MWM) y la memoria de localización de objetos (OLM) impidió la adquisición de la información espacial, por lo que la memoria no se expresó conductualmente durante la LTM. En este sentido, reportes previos indican que el aprendizaje aumenta temporalmente la palmitoilación de proteínas para establecer la memoria espacial (Li et al., 2010; Brigidi et al., 2015). Los resultados sugieren que la inhibición de la actividad de las enzimas PATs antes de la adquisición impide la memoria de corto plazo (STM) y la memoria de largo plazo (LTM). En este sentido, se ha reportado que la STM requiere una modificación postraducciona transitoria y no estabilizada de proteínas. Por ejemplo, la fosforilación de PSD95 y NMDAR (Fukata et al., 2004; Hayashi et al., 2021) induce cambios plásticos en las redes neuronales involucradas (Morgado-Bernal, 2011) que pueden ser transitorios o de larga duración. Además, se ha observado la movilización lateral de los receptores glutamatérgicos en la membrana celular hacia las balsas lipídicas durante el aprendizaje espacial (Delint-Ramirez et al., 2008), un proceso regulado por la palmitoilación de proteínas (Linder & Deschenes, 2007; Levental et al., 2010; Delint-Ramírez et al., 2011;

Nadolski & Linder, 2007; Kim et al., 2013; Ernst et al., 2018). Por lo tanto, se sugiere que el bloqueo de la actividad de las enzimas PATs potencialmente afecta las dinámicas de transporte, localización, movilización a través de balsas lipídicas e interacciones proteína-proteína durante la formación de la memoria espacial. Al respecto, recientemente se ha reportado que la actividad de la enzima PAT DHHC2 en el hipocampo es necesaria para la formación de memoria de miedo contextual y la plasticidad sináptica. El silenciamiento del mRNA para la síntesis de la enzima DHHC2 reduce la capacidad de la proteína AKAP150 para asociarse con la proteína PSD-95, interacción clave para la inserción de receptores AMPA en la sinapsis, proceso necesario para la plasticidad sináptica y el aprendizaje (Meng-Die et al., 2022). Dado que la inhibición bonafide de la actividad de las enzimas PATs impidió la adquisición de la memoria espacial en ambos modelos conductuales, las ratas no expresaron STM o LTM, lo que se evidencia en una latencia más prolongada para encontrar la plataforma y un menor número de cruces a través del área de la plataforma en MWM, y un menor índice de reconocimiento en el OLM. Estos resultados sugieren que la actividad de las enzimas PATs dentro de CA1 es necesaria para el aprendizaje de la memoria espacial.

#### *La consolidación de la memoria espacial requiere la palmitoilación de proteínas*

Los procesos moleculares que comienzan durante el entrenamiento se extienden a eventos posteriores que subyacen a la consolidación (Abel y Lattal, 2001; Florian & Roulet, 2004). Los resultados sugieren que una vez que las ratas aprenden información espacial en los paradigmas MWM y OLM, la inhibición de la actividad de las enzimas PATs impide la consolidación de la memoria. Esto sugiere que el deterioro de la consolidación podría ser consecuencia de una interrupción de la síntesis de proteínas *de novo* o del tráfico de proteínas preexistentes. La síntesis de proteínas requiere de la activación de vías de señalización dependientes de la entrada de cationes a las neuronas. La entrada de cationes depende de receptores ionotrópicos y canales iónicos dependientes de voltaje, cuya localización, movilización lateral e interacción con otras proteínas (como las proteínas de ensamblaje) son regulados por palmitoilación (Thomas & Huganir, 2013; Jeyifous et al., 2016; Hayashi, 2021; Cassinelli et al., 2022). Debido a que, el calcio intracelular activa proteínas cinasas, como PKA, PKC, CAMKII, calcio/Calmodulina, entre otras, que activan a factores de transcripción que se translocan al núcleo e inician la transcripción para la síntesis de proteínas (Hernandez & Abel, 2008; Zhou et al., 2011; Jarome & Helmstetter, 2014). La inhibición de la palmitoilación después del aprendizaje podría reducir la capacidad de estos mecanismos de entrada de iones para activar las vías de señalización que permiten la síntesis proteica; o bien podría promoverse la síntesis proteica, pero la movilización de dichas proteínas podría estar

alterada, impidiendo su funcionamiento normal e impactando en la consolidación de la memoria espacial. Por lo tanto, se evaluó la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y sinapsina (Syn) en el hipocampo, como consecuencia del entrenamiento en el laberinto acuático de Morris y bajo los efectos del inhibidor 2-bromopalmitato. BDNF es una proteína de expresión temprana necesaria para la inducción de la plasticidad sináptica y la consolidación de la memoria espacial. En el hipocampo, BDNF activa la vía TrkB/IP3, la cual es esencial para la consolidación de la memoria espacial (Yamada & Nabeshima, 2003) y la plasticidad sináptica (Rose et al., 2004; He et al., 2005). Además, la disminución de la expresión del BDNF o el uso de inhibidores de su receptor TrkB han demostrado tener efectos perjudiciales sobre la formación de la memoria (Bekinschtein et al., 2008; Cunha et al., 2010; Papaleo et al., 2011). A su vez, la activación de los receptores TrkB presinápticos dependiente de BDNF promueve la fosforilación de la proteína sinapsina, la cual regula la neurotransmisión en las terminales presinápticas, siendo actores claves en la modulación fina de la plasticidad neuronal (Cesca et al., 2010) y en la consolidación de la memoria espacial (Yu et al., 2022). Estas evidencias apoyan el papel crucial de las proteínas BDNF y sinapsina en la plasticidad neuronal y en la formación y retención de la memoria.

*La expresión de las proteínas BDNF y sinapsina en el hipocampo requieren de la actividad de las enzimas PATs*

El aprendizaje espacial induce el incremento en la expresión de proteínas que participan en el remodelamiento de la arquitectura sináptica, modificando las propiedades y fuerza de la comunicación neuronal, a través de la formación de nuevas conexiones sinápticas para permitir el almacenamiento de dicha información y conducir el paso de las modificaciones sinápticas de una memoria lábil y temporal a una memoria de largo plazo (Yamada et al., 2017). El efecto de la inhibición de las enzimas PATs después del entrenamiento en la LTM sugiere una interferencia con los mecanismos celulares de consolidación. Una posible explicación es que la inhibición de la palmitoilación de proteínas interfiere con el proceso de síntesis proteica, que podría ocurrir a dos niveles diferentes. A nivel transcripcional, la inhibición de la palmitoilación de proteínas podría impedir que se activen los mecanismos de flujo catiónico que conllevan a la translocación de factores de transcripción al núcleo para iniciar la transcripción del mRNA, un proceso descrito tanto en plasticidad sináptica como en la consolidación de la memoria (West et al., 2002; Kandel et al., 2014; Goto, 2022). Igualmente, la palmitoilación de las histonas H3 y H4 modifica la estabilidad de los tetrámeros H3/H4, para promover el relajamiento de la cromatina (Wilson et al., 2011; Jin et al., 2020) y la transcripción global del mRNA, puesto que la palmitoilación de la histona H4 incrementa la

actividad de la RNA polimerasa II. De manera interesante se ha mostrado que la palmitoilación de la histona H4 está controlada por enzimas PATs dependientes de calcio (Zou et al., 2011). A nivel postraduccional, la palmitoilación se requiere para el transporte y distribución de las proteínas a sus destinos celulares (Greaves & Chamberlain, 2007). Debido a esto, surge la hipótesis de que la inhibición de la palmitoilación de proteínas no afecta los mecanismos asociados a la síntesis proteica, pero las proteínas no pueden ejercer su función adecuadamente puesto que los mecanismos de transporte y distribución han sido abatidos, impidiendo la consolidación de la memoria espacial. La aproximación experimental utilizada muestra que el aprendizaje espacial induce un aumento en la cantidad de las proteínas BDNF y sinapsina, y esta cantidad se ve reducida como consecuencia de la inhibición de la palmitoilación de proteínas. Estos resultados sugieren entonces que la palmitoilación de proteínas se requiere para la síntesis proteica, y su inhibición irrumpe con los procesos de consolidación de la memoria espacial. Este efecto ha sido ampliamente reportado. El impedimento del proceso de consolidación mediante manipulaciones farmacológicas como los inhibidores de la síntesis de proteínas atenúa la estabilización de nuevas conexiones sinápticas, lo que da como resultado un deterioro en el mantenimiento de la memoria espacial (Bradshaw et al., 2003; Raven et al., 2021; Kaushik et al., 2022; Guo et al., 2023). La estabilización de una memoria implica, entre otros, cambios de permeabilidad al calcio en los receptores AMPA en la postsinapsis, un mecanismo regulado por el recambio en el ciclo de palmitoilación/despalmitolación de proteínas (Dekker et al., 2010; Fukata & Fukata, 2010; Lin & Conibear, 2015) para activar los mecanismos de síntesis de nuevas proteínas.

Estos resultados y la aproximación experimental utilizada en este trabajo no permiten descartar la posibilidad de que la disminución en la cantidad de las proteínas BDNF y sinapsina como consecuencia de la inhibición de la palmitoilación de proteínas, sea a causa de una mayor tasa de degradación proteica vía el sistema ubiquitina-proteosoma. Sin embargo, se ha reportado que la palmitoilación de proteínas facilita la degradación de las mismas a través del sistema ubiquitin-proteosoma (Holland & Thomas, 2017), incluyendo a la proteína  $\beta$ -catenina (Zhang et al., 2023), por lo que la inhibición de la palmitoilación de proteínas debería incrementar, pero no disminuir, la cantidad de proteína BDNF y sinapsina. Adicionalmente, la cantidad de las proteínas BDNF y sinapsina como consecuencia de la inhibición de la palmitoilación es similar a la cantidad de las proteínas BDNF y sinapsina en los grupos control, lo que sugiere una reducción en la síntesis de proteínas, pero no un incremento de la tasa de degradación vía el sistema ubiquitin-proteosoma.

*La palmitoilación de proteínas es necesaria durante la comunicación basal entre las neuronas presinápticas del CA3 y las neuronas postsinápticas del CA1 y para la inducción de la plasticidad sináptica en el hipocampo*

El análisis electrofisiológico muestra una comunicación basal disminuida como resultado de la inhibición bonafide de la actividad de las enzimas PATs en la vía de las colaterales de Schaffer en el hipocampo. La transmisión basal depende de mecanismos celulares presinápticos y postsinápticos para controlar la comunicación de neurona a neurona. En la neurona presináptica, la palmitoilación de proteínas como sinapsina, entre otras, regula la fusión de las vesículas sinápticas para la liberación de neurotransmisores (Fasshauer et al., 1997; Veit et al., 2000; Prescott et al., 2009). Adicionalmente, la comunicación neuronal requiere de receptores postsinápticos de neurotransmisores excitatorios en la hendidura sináptica, principalmente los receptores NMDA y AMPA (Reiner & Levitz, 2018). En este sentido, la movilización lateral y la actividad de estos receptores está mediada por la palmitoilación de proteínas (El-Husseini et al., 2002; Thomas & Huganir, 2013; Jeyifous et al., 2016), por lo que la disminución de la transmisión basal y la alteración de la facilitación sináptica debido a la inhibición de las enzimas PATs podría explicar las alteraciones de mecanismos presinápticos y postsinápticos que causen esta disminución de la comunicación durante la actividad basal. Es importante destacar que, aunque se han reportado enzimas PATs dependientes de actividad en el hipocampo (Brigidi et al., 2015; Shimell et al., 2021), nuestros hallazgos sugieren la existencia de enzimas PATs que también regulan los mecanismos celulares durante la actividad neuronal basal.

Aunque hay muchas preguntas sobre la potenciación de largo plazo (LTP) como modelo explicativo de los mecanismos neuronales para la formación y el mantenimiento de la memoria, el estudio de la LTP ha proporcionado una forma de identificar y caracterizar los mecanismos moleculares que potencialmente subyacen al almacenamiento de la memoria (Rosenberg et al., 2014). Los resultados obtenidos en el protocolo de LTP in vivo revelan que la inhibición de las enzimas PATs tiene un impacto significativo en la inducción de la LTP. Esto sugiere que los mecanismos moleculares que participan en la inducción de la LTP, entre los que se incluyen la exocitosis y la movilización de proteínas, como los receptores glutamatérgicos, están sujetos a regulación por parte de las enzimas PATs. Sin embargo, es importante destacar que esta regulación puede implicar otros mecanismos de modificación postraduccional que también participan en la inducción de la LTP (Spinelli et al., 2017, Yokoi et al., 2016). Está ampliamente reconocido que la activación del receptor NMDA postsináptico en la LTP del hipocampo induce tráfico y modificaciones de los receptores AMPA y otras proteínas de manera secuencial de manera rápida en la membrana postsináptica para

modular la fuerza de la transmisión sináptica (Hayashi, 2021). Además, se sabe que la actividad de los receptores NMDA se regula dinámicamente a través de la palmitoilación de proteínas (Traynelis et al., 2010; Lussier et al., 2015), para inducir la activación de vías de señalización directamente moduladas por el  $\text{Ca}^{+}$  intracelular. Por lo tanto, las modificaciones postraduccionales desencadenadas por  $\text{Ca}^{+}$ , incluida la palmitoilación de proteínas, regulan la actividad de los receptores glutamatérgicos para inducir plasticidad sináptica. Sin embargo, la potenciación en la comunicación neuronal no se alteró hasta los 90 minutos a pesar de la inhibición de las enzimas PATs después de la inducción de LTP. Esto sugiere que una vez que la fase de remodelamiento rápido en la movilización y relocalización de las proteínas sinápticas ha concluido, la participación de la palmitoilación de proteínas es menor o nula, dado que la arquitectura sináptica es más estable y el tiempo de vida media de las proteínas modificadas es mayor.

#### *La evocación de la memoria espacial no requiere de palmitoilación de proteínas*

De igual manera, una vez que la memoria espacial se encuentra estable, la inhibición de las enzimas PATs ya no afecta la expresión conductual de dicha memoria, tanto en el MWM como en el OLM durante la evocación. No obstante, actualmente se sabe que la evocación de la memoria no es un proceso pasivo. Una vez que se evoca una memoria, la traza de la memoria se desestabiliza y se activan mecanismos moleculares que inducen cambios plásticos para actualizarla, un proceso denominado reconsolidación (Rossato et al., 2006). Aunque todavía se desconoce, es posible que la reconsolidación probablemente requiera la actividad de las enzimas PATs para inducir los cambios plásticos necesarios a fin de actualizar las trazas de memoria. Por otro lado, se ha demostrado que las nuevas memorias relacionadas con el hipocampo se integran de manera gradual con las memorias ya existentes y se transfieren progresivamente a las estructuras corticales, lo que reduce la dependencia del hipocampo. En consecuencia, no podemos descartar la posibilidad de que la transferencia de información espacial desde el hipocampo a las estructuras corticales haya tenido lugar antes de la LTM. En este contexto, cabe esperar que la inhibición de la palmitoilación en el hipocampo ya no tenga un impacto en la evocación conductual de la memoria espacial. En este sentido, se ha planteado la transferencia de la memoria desde el hipocampo a las estructuras corticales implica sucesivas reactivaciones de los circuitos cortico-hipocampales, lo que demanda un periodo de tiempo relativamente prolongado, que podría extenderse durante semanas, meses o incluso años, aunque este proceso comienza días después de la formación de la memoria (Mednick et al., 2011). Por otro lado, diversos informes sugieren que la alteración o inhibición de los circuitos hipocampales antes de la evocación de la memoria

espacial 24 horas después del entrenamiento impide su expresión conductual (Akbari et al., 2006; Dubue et al., 2015; Ashourpour et al., 2022). Adicionalmente, los resultados de la inhibición de la palmitoilación después de la estimulación de alta frecuencia para inducir LTP sugieren que una vez que se han completado los procesos de plasticidad sináptica que tienen lugar durante la formación y consolidación de la memoria, la inhibición de la palmitoilación ya no afecta la comunicación sináptica. En conjunto, estas evidencias respaldan la hipótesis de que la palmitoilación de proteínas en el hipocampo ya no es necesaria una vez que la memoria espacial ha sido consolidada.

### *Perspectivas*

Los hallazgos reportados en esta investigación indican que la administración del 2-bromopalmitato interfiere en los procesos de aprendizaje y la formación de la memoria, lo que sugiere que dichos procesos requieren de la palmitoilación de proteínas. Sin embargo, no se analizó si la inhibición de la palmitoilación de proteínas en efecto había ocurrido. Aunque el efecto inhibitorio del 2-bromopalmitato en la palmitoilación de proteínas ha sido ampliamente reportado, la medición de la palmitoilación de proteínas bajo el efecto del 2-bromopalmitato usando los protocolos conductuales o electrofisiológicos empleados en este trabajo fortalecería las hipótesis aquí expuestas.

Aunado a lo anterior, es importante destacar que las aproximaciones experimentales utilizadas en este estudio no permiten identificar con precisión las vías moleculares específicas a través de las cuales la palmitoilación de proteínas afectaría la adquisición y consolidación de la memoria espacial. Esta limitación se debe en gran medida a la naturaleza no selectiva del inhibidor empleado, que se une a todas las enzimas PATs.

Dado que la palmitoilación de proteínas influye en numerosas proteínas sinápticas, es plausible que este inhibidor afecte la actividad general de todas las enzimas PATs. Puesto que no existe inhibidores selectivos de las enzimas PATs, resulta complicado discernir cuáles de las 23 enzimas PATs previamente reportadas desempeñan un papel específico en las fases de adquisición y consolidación de la memoria espacial, así como en los procesos de plasticidad sináptica.

Para abordar esta limitación, se sugiere que la generación de mutantes con pérdida de función de cada una de las enzimas PATs identificadas en el sistema nervioso central permitiría un análisis más detallado de los mecanismos subyacentes a la palmitoilación en la

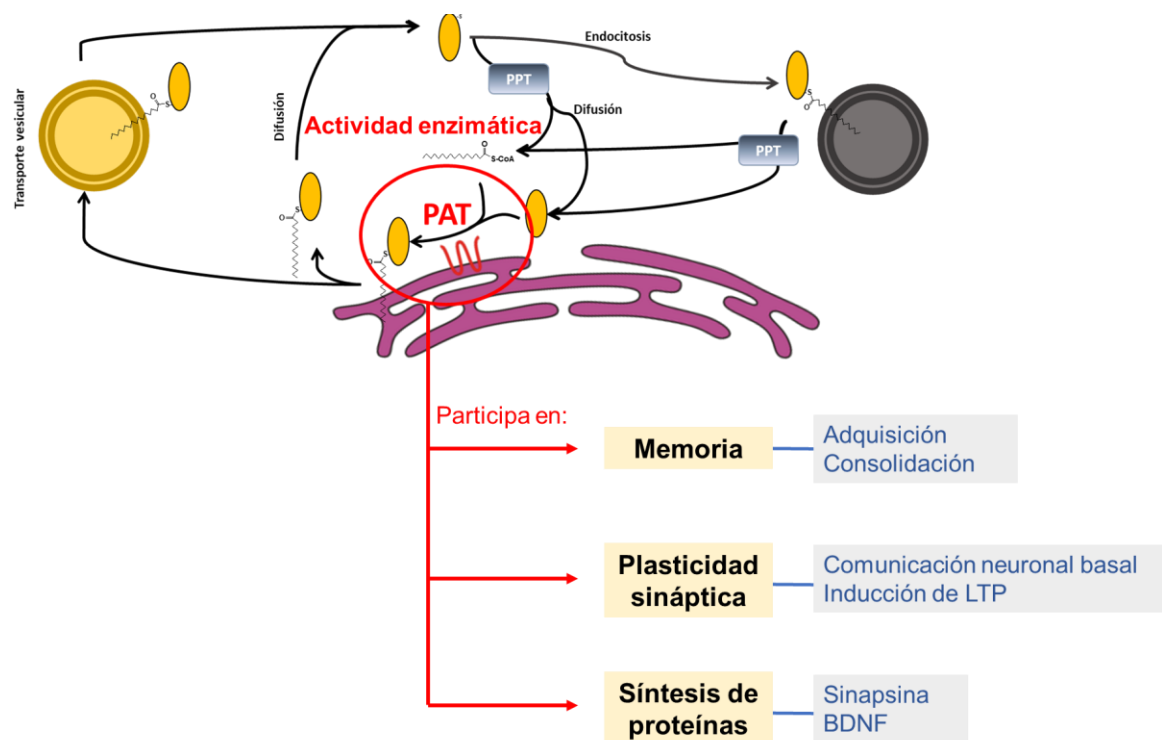
formación y el mantenimiento de la memoria espacial, así como las vías moleculares involucradas.

Adicionalmente, es probable que la dinámica de palmitoilación de proteínas esté sujeta a una regulación temporal. Por lo tanto, sería de interés investigar la regulación temporal de proteínas clave en los procesos de aprendizaje y memoria, como, por ejemplo, las proteínas de ensamblaje (PSD95, AKAP 150) y los receptores glutamatérgicos (NMDA y AMPA). Esto podría lograrse mediante el uso de metodologías que permitan el intercambio de grupos lipídicos por compuestos biotinilados, lo que facilitaría su visualización. En estudios previos, este enfoque experimental ha permitido identificar la palmitoilación de  $\delta$ -catenina dentro de la primera hora después de la adquisición en un protocolo de condicionamiento al miedo contextual, y su inhibición se asoció con una disminución en el aprendizaje (Brigidi et al., 2014).

Por último, los resultados de la investigación sugieren que la palmitoilación de proteínas es esencial para la síntesis de proteínas durante la consolidación de la memoria espacial. No obstante, el estudio no proporciona información sobre si la inhibición de la palmitoilación afecta la transcripción de los genes BDNF y sinapsina. Para abordar esta interrogante, sería relevante llevar a cabo la determinación de la expresión del mRNA mediante qRT-PCR de estos genes, así como de otros genes de expresión temprana. Estos análisis ayudarían a aclarar el posible impacto de la inhibición de la palmitoilación en la regulación génica asociada con la consolidación de la memoria espacial.



## 8. CONCLUSIÓN



A nivel conductual, la adquisición y consolidación, pero no la evocación, de la memoria espacial requieren de la palmitoilación de proteínas. Además, los mecanismos de plasticidad sináptica también dependen de la palmitoilación de proteínas, tanto en la comunicación neuronal basal como en la inducción de la LTP. Sin embargo, una vez inducida la LTP, la administración de un fármaco que inhibe la palmitoilación de proteínas no altera la comunicación sináptica. Por último, la expresión de las proteínas sinapsina y BDNF, requeridas durante la consolidación de la memoria espacial, es dependiente de la palmitoilación de proteínas.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott LF, Nelson SB. Synaptic plasticity: taming the beast. *Nat Neurosci*. 2000 Nov;3 Suppl:1178-83. doi: 10.1038/81453. PMID: 11127835.
- Abel T, Lattal KM. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr Opin Neurobiol*. 2001 Apr;11(2):180-7. doi: 10.1016/s0959-4388(00)00194-x. PMID: 11301237.
- Adams JP, Sweatt JD. Molecular psychology: roles for the ERK MAP kinase cascade in memory. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2002;42:135-63. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.42.082701.145401. PMID: 11807168.
- Aid T, Kazantseva A, Piirsoo M, Palm K, Timmusk T. Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J Neurosci Res*. 2007 Feb 15;85(3):525-35. doi: 10.1002/jnr.21139. PMID: 17149751; PMCID: PMC1878509.
- Akbari E, Naghdi N, Motamedi F. Functional inactivation of orexin 1 receptors in CA1 region impairs acquisition, consolidation and retrieval in Morris water maze task. *Behav Brain Res*. 2006 Oct 2;173(1):47-52. doi: 10.1016/j.bbr.2006.05.028. Epub 2006 Jul 3. PMID: 16815564.
- Andero R, Choi DC, Ressler KJ. BDNF-TrkB receptor regulation of distributed adult neural plasticity, memory formation, and psychiatric disorders. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2014;122:169-92. doi: 10.1016/B978-0-12-420170-5.00006-4. PMID: 24484701.
- Angers A, Fioravante D, Chin J, Cleary LJ, Bean AJ, Byrne JH. Serotonin stimulates phosphorylation of Aplysia synapsin and alters its subcellular distribution in sensory neurons. *J Neurosci*. 2002 Jul 1;22(13):5412-22. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-13-05412.2002. PMID: 12097493; PMCID: PMC6758201.
- Armstrong JN, Saganich MJ, Xu NJ, Henkemeyer M, Heinemann SF, Contractor A. B-ephrin reverse signaling is required for NMDA-independent long-term potentiation of mossy fibers in the hippocampus. *J Neurosci*. 2006 Mar 29;26(13):3474-81. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4338-05.2006. PMID: 16571754; PMCID: PMC6673859.
- Ashourpour F, Jafari A, Babaei P. Co-treatment of AMPA endocytosis inhibitor and GluN2B antagonist facilitate consolidation and retrieval of memory impaired by  $\beta$  amyloid peptide. *Int J Neurosci*. 2022 Jul;132(7):714-723. doi: 10.1080/00207454.2020.1837800. Epub 2020 Oct 28. PMID: 33115292.
- Atukorala I, Mathivanan S. The Role of Post-Translational Modifications in Targeting Protein Cargo to Extracellular Vesicles. *Subcell Biochem*. 2021;97:45-60. doi: 10.1007/978-3-030-67171-6\_3. PMID: 33779913.
- AtukoralaInaba H, Kai D, Kida S. N-glycosylation in the hippocampus is required for the consolidation and reconsolidation of contextual fear memory. *Neurobiol Learn Mem*. 2016 Nov;135:57-65. doi: 10.1016/j.nlm.2016.06.018. Epub 2016 Jun 21. PMID: 27343988.
- Baekelandt V, Arckens L, Annaert W, Eysel UT, Orban GA, Vandesande F. Alterations in GAP-43 and synapsin immunoreactivity provide evidence for synaptic reorganization in adult cat dorsal lateral geniculate nucleus following retinal lesions. *Eur J Neurosci*. 1994 May 1;6(5):754-65. doi: 10.1111/j.1460-9568.1994.tb00987.x. PMID: 8075819.
- Bahari-Javan S, Maddalena A, Kerimoglu C, Wittnam J, Held T, Bähr M, Burkhardt S, Delalle I, Kügler S, Fischer A, Sananbenesi F. HDAC1 regulates fear extinction in mice. *J Neurosci*. 2012 Apr 11;32(15):5062-73. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0079-12.2012. PMID: 22496552; PMCID: PMC6622110.
- Balderas I, Rodriguez-Ortiz CJ, Salgado-Tonda P, Chavez-Hurtado J, McGaugh JL, Bermudez-Rattoni F. The consolidation of object and context recognition memory involve different regions of the temporal lobe. *Learn Mem*. 2008 Aug 21;15(9):618-24. doi: 10.1101/lm.1028008. PMID: 18723431; PMCID: PMC2632790.
- Baltaci SB, Mogulkoc R, Baltaci AK. Molecular Mechanisms of Early and Late LTP. *Neurochem Res*. 2019 Feb;44(2):281-296. doi: 10.1007/s11064-018-2695-4. Epub 2018 Dec 6. PMID: 30523578.
- Barnes CA, Jung MW, McNaughton BL, Korol DL, Andreasson K, Worley PF. LTP saturation and spatial learning disruption: effects of task variables and saturation levels. *J Neurosci*. 1994 Oct;14(10):5793-806. doi: 10.1523/JNEUROSCI.14-10-05793.1994. PMID: 7931545; PMCID: PMC6576980.
- Barnes CA, Rao G, Foster TC, McNaughton BL. Region-specific age effects on AMPA sensitivity: electrophysiological evidence for loss of synaptic contacts in hippocampal field CA1. *Hippocampus*. 1992 Oct;2(4):457-68. doi: 10.1002/hipo.450020413. PMID: 1284976.

- Barnes CA, Rao G, Houston FP. LTP induction threshold change in old rats at the perforant path--granule cell synapse. *Neurobiol Aging*. 2000 Sep-Oct;21(5):613-20. doi: 10.1016/s0197-4580(00)00163-9. PMID: 11016529.
- Bechara RG, Lyne R, Kelly AM. BDNF-stimulated intracellular signalling mechanisms underlie exercise-induced improvement in spatial memory in the male Wistar rat. *Behav Brain Res*. 2014 Dec 15;275:297-306. doi: 10.1016/j.bbr.2013.11.015. Epub 2013 Nov 21. PMID: 24269499.
- Bekhouche B, Tourville A, Ravichandran Y, Tacine R, Abrami L, Dussiot M, Khau-Dancasius A, Boccara O, Khirat M, Mangeney M, Dingli F, Loew D, Boëda B, Jordan P, Molina TJ, Bellon N, Fraitag S, Hadj-Rabia S, Blanche S, Puel A, Etienne-Manneville S, van der Goot FG, Cherfils J, Hermine O, Casanova JL, Bodemer C, Smahi A, Delon J. A toxic palmitoylation of Cdc42 enhances NF- $\kappa$ B signaling and drives a severe autoinflammatory syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 2020 Nov;146(5):1201-1204.e8. doi: 10.1016/j.jaci.2020.03.020. Epub 2020 Apr 10. PMID: 32283203.
- Bekinschtein P, Cammarota M, Katche C, Slipczuk L, Rossato JI, Goldin A, Izquierdo I, Medina JH. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Feb 19;105(7):2711-6. doi: 10.1073/pnas.0711863105. Epub 2008 Feb 8. PMID: 18263738; PMCID: PMC2268201.
- Ben-Yakov A, Dudai Y, Mayford MR. Memory Retrieval in Mice and Men. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015 Oct 5;7(12):a021790. doi: 10.1101/cshperspect.a021790. PMID: 26438596; PMCID: PMC4665077.
- Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 1993 Jan 7;361(6407):31-9. doi: 10.1038/361031a0. PMID: 8421494.
- 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. doi: 10.1113/jphysiol.1973.sp010273. PMID: 4727084; PMCID: PMC1350458.
- Bourtchouladze R, Abel T, Berman N, Gordon R, Lapidus K, Kandel ER. Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. *Learn Mem*. 1998 Sep-Oct;5(4-5):365-74. PMID: 10454361; PMCID: PMC311273.
- Bouteiller JM, Allam SL, Greget R, Ambert N, Hu EY, Bischoff S, Baudry M, Berger TW. Paired-pulse stimulation at glutamatergic synapses - pre- and postsynaptic components. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc*. 2010;2010:787-90. doi: 10.1109/IEMBS.2010.5626491. PMID: 21096110.
- Bozdagi O, Shan W, Tanaka H, Benson DL, Huntley GW. Increasing numbers of synaptic puncta during late-phase LTP: N-cadherin is synthesized, recruited to synaptic sites, and required for potentiation. *Neuron*. 2000 Oct;28(1):245-59. doi: 10.1016/s0896-6273(00)00100-8. PMID: 11086998.
- Bradberry MM, Peters-Clarke TM, Shishkova E, Chapman ER, Coon JJ. N-glycoproteomics of brain synapses and synaptic vesicles. *Cell Rep*. 2023 Apr 9;42(4):112368. doi: 10.1016/j.celrep.2023.112368. Epub ahead of print. PMID: 37036808.
- Bradshaw KD, Emptage NJ, Bliss TV. A role for dendritic protein synthesis in hippocampal late LTP. *Eur J Neurosci*. 2003 Dec;18(11):3150-2. doi: 10.1111/j.1460-9568.2003.03054.x. PMID: 14656312.
- Brigidi GS, Santyr B, Shimell J, Jovellar B, Bamji SX. Activity-regulated trafficking of the palmitoyl-acyl transferase DHHC5. *Nat Commun*. 2015 Sep 3;6:8200. doi: 10.1038/ncomms9200. PMID: 26334723; PMCID: PMC4569850.
- Brigidi GS, Sun Y, Beccano-Kelly D, Pitman K, Mobasser M, Borgland SL, Milnerwood AJ, Bamji SX. Palmitoylation of  $\delta$ -catenin by DHHC5 mediates activity-induced synapse plasticity. *Nat Neurosci*. 2014 Apr;17(4):522-32. doi: 10.1038/nn.3657. Epub 2014 Feb 23. PMID: 24562000; PMCID: PMC5025286.
- Brown RE, Donald O. Hebb and the Organization of Behavior: 17 years in the writing. *Mol Brain*. 2020 Apr 6;13(1):55. doi: 10.1186/s13041-020-00567-8. PMID: 32252813; PMCID: PMC7137474.
- Brun VH, Ytterbo K, Morris RG, Moser MB, Moser EI. Retrograde amnesia for spatial memory induced by NMDA receptor-mediated long-term potentiation. *J Neurosci*. 2001 Jan 1;21(1):356-62. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-01-00356.2001. PMID: 11150353; PMCID: PMC6762446.
- Buszka A, Pytyś A, Colvin D, Włodarczyk J, Wójtowicz T. S-Palmitoylation of Synaptic Proteins in Neuronal Plasticity in Normal and Pathological Brains. *Cells*. 2023 Jan 21;12(3):387. doi: 10.3390/cells12030387. PMID: 36766729; PMCID: PMC9913408.

- Bye CM, McDonald RJ. A Specific Role of Hippocampal NMDA Receptors and Arc Protein in Rapid Encoding of Novel Environmental Representations and a More General Long-Term Consolidation Function. *Front Behav Neurosci*. 2019 Feb 26;13:8. doi: 0.3389/fnbeh.2019.00008. PMID: 30863289; PMCID: PMC6399163.
- Bykhovskaia M. Synapsin regulation of vesicle organization and functional pools. *Semin Cell Dev Biol*. 2011 Jun;22(4):387-92. doi: 10.1016/j.semcd.2011.07.003. Epub 2011 Jul 31. PMID: 21827866.
- Carmichael RE, Henley JM. Transcriptional and post-translational regulation of Arc in synaptic plasticity. *Semin Cell Dev Biol*. 2018 May;77:3-9. doi: 10.1016/j.semcd.2017.09.007. Epub 2017 Sep 7. PMID: 28890422.
- Carnino JM, Ni K, Jin Y. Post-translational Modification Regulates Formation and Cargo-Loading of Extracellular Vesicles. *Front Immunol*. 2020 May 22;11:948. doi: 10.3389/fimmu.2020.00948. PMID: 32528471; PMCID: PMC7257894.
- Cassinelli S, Viñola-Renart C, Benavente-García A, Navarro-Pérez M, Capera J, Felipe A. Palmitoylation of Voltage-Gated Ion Channels. *Int J Mol Sci*. 2022 Aug 19;23(16):9357. doi: 10.3390/ijms23169357. PMID: 36012639; PMCID: PMC9409123.
- Castellucci VF, Carew TJ, Kandel ER. Cellular analysis of long-term habituation of the gill-withdrawal reflex of *Aplysia californica*. *Science*. 1978 Dec 22;202(4374):1306-8. doi: 10.1126/science.214854. PMID: 214854.
- Cesca F, Baldelli P, Valtorta F, Benfenati F. The synapsins: key actors of synapse function and plasticity. *Prog Neurobiol*. 2010 Aug;91(4):313-48. doi: 10.1016/j.pneurobio.2010.04.006. Epub 2010 May 10. Erratum in: *Prog Neurobiol*. 2011 Apr;93(4):549. PMID: 20438797.
- Chamberlain LH, Shipston MJ. The physiology of protein S-acylation. *Physiol Rev*. 2015 Apr;95(2):341-76. doi: 10.1152/physrev.00032.2014. PMID: 25834228; PMCID: PMC4551212.
- Chase JF, Tubbs PK. Specific inhibition of mitochondrial fatty acid oxidation by 2-bromopalmitate and its coenzyme A and carnitine esters. *Biochem J*. 1972 Aug;129(1):55-65. doi: 10.1042/bj1290055. PMID: 4646779; PMCID: PMC1174041.
- Cheng PL, Song AH, Wong YH, Wang S, Zhang X, Poo MM. Self-amplifying autocrine actions of BDNF in axon development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Nov 8;108(45):18430-5. doi: 10.1073/pnas.1115907108. Epub 2011 Oct 24. PMID: 22025720; PMCID: PMC3215064.
- Chi P, Greengard P, Ryan TA. Synaptic vesicle mobilization is regulated by distinct synapsin I phosphorylation pathways at different frequencies. *Neuron*. 2003 Apr 10;38(1):69-78. doi: 10.1016/s0896-6273(03)00151-x. PMID: 12691665.
- Chong LW, Tsai CL, Yang KC, Liao CC, Hsu YC. Targeting protein palmitoylation decreases palmitate-induced sphere formation of human liver cancer cells. *Mol Med Rep*. 2020 Aug;22(2):939-947. doi: 10.3892/mmr.2020.11172. Epub 2020 May 22. PMID: 32468006; PMCID: PMC7339714.
- Clopath C. Synaptic consolidation: an approach to long-term learning. *Cogn Neurodyn*. 2012 Jun;6(3):251-7. doi: 10.1007/s11571-011-9177-6. Epub 2011 Oct 22. PMID: 23730356; PMCID: PMC3368062.
- Coleman DT, Gray AL, Kridel SJ, Cardelli JA. Palmitoylation regulates the intracellular trafficking and stability of c-Met. *Oncotarget*. 2016 May 31;7(22):32664-77. doi: 10.18632/oncotarget.8706. PMID: 27081699; PMCID: PMC5078042.
- Coleman RA, Rao P, Fogelsong RJ, Bardes ES. 2-Bromopalmitoyl-CoA and 2-bromopalmitate: promiscuous inhibitors of membrane-bound enzymes. *Biochim Biophys Acta*. 1992 Apr 23;1125(2):203-9. doi: 10.1016/0005-2760(92)90046-x. PMID: 1571364.
- Conibear E, Davis NG. Palmitoylation and depalmitoylation dynamics at a glance. *J Cell Sci*. 2010 Dec 1;123(Pt 23):4007-10. doi: 10.1242/jcs.059287. PMID: 21084560; PMCID: PMC2987437.
- Conner JM, Lauterborn JC, Yan Q, Gall CM, Varon S. Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *J Neurosci*. 1997 Apr 1;17(7):2295-313. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-07-02295.1997. PMID: 9065491; PMCID: PMC6573520.
- Cooper RA, Ritchey M. Cortico-hippocampal network connections support the multidimensional quality of episodic memory. *Elife*. 2019 Mar 22;8:e45591. doi: 10.7554/eLife.45591. PMID: 30900990; PMCID: PMC6450667.
- Corti E, Duarte CB. The role of post-translational modifications in synaptic AMPA receptor activity. *Biochem Soc Trans*. 2023 Feb 27;51(1):315-330. doi: 10.1042/BST20220827. PMID: 36629507.

- Costa-Mattioli M, Sossin WS, Klann E, Sonenberg N. Translational control of long-lasting synaptic plasticity and memory. *Neuron*. 2009 Jan 15;61(1):10-26. doi: 10.1016/j.neuron.2008.10.055. PMID: 19146809; PMCID: PMC5154738.
- Cowan N. What are the differences between long-term, short-term, and working memory? *Prog Brain Res*. 2008;169:323-38. doi: 10.1016/S0079-6123(07)00020-9. PMID: 18394484; PMCID: PMC2657600.
- Craddock TJ, Tuszynski JA, Hameroff S. Cytoskeletal signaling: is memory encoded in microtubule lattices by CaMKII phosphorylation? *PLoS Comput Biol*. 2012;8(3):e1002421. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002421. Epub 2012 Mar 8. PMID: 22412364; PMCID: PMC3297561.
- Cunha C, Brambilla R, Thomas KL. A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci*. 2010 Feb 9;3:1. doi: 10.3389/neuro.02.001.2010. PMID: 20162032; PMCID: PMC2821174.
- Davda D, El Azzouny MA, Tom CT, Hernandez JL, Majmudar JD, Kennedy RT, Martin BR. Profiling targets of the irreversible palmitoylation inhibitor 2-bromopalmitate. *ACS Chem Biol*. 2013 Sep 20;8(9):1912-7. doi: 10.1021/cb400380s. Epub 2013 Jul 25. PMID: 23844586; PMCID: PMC3892994.
- Dekker FJ, Rocks O, Vartak N, Menninger S, Hedberg C, Balamurugan R, Wetzel S, Renner S, Gerauer M, Schölermann B, Rusch M, Kramer JW, Rauh D, Coates GW, Brunsveld L, Bastiaens PI, Waldmann H. Small-molecule inhibition of APT1 affects Ras localization and signaling. *Nat Chem Biol*. 2010 Jun;6(6):449-56. doi: 10.1038/nchembio.362. Epub 2010 Apr 25. PMID: 20418879.
- Delint-Ramírez I, Salcedo-Tello P, Bermudez-Rattoni F. Spatial memory formation induces recruitment of NMDA receptor and PSD-95 to synaptic lipid rafts. *J Neurochem*. 2008 Aug;106(4):1658-68. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05523.x. PMID: 18700282.
- Delint-Ramírez I, Willoughby D, Hammond GR, Ayling LJ, Cooper DM. Palmitoylation targets AKAP79 protein to lipid rafts and promotes its regulation of calcium-sensitive adenylyl cyclase type 8. *J Biol Chem*. 2011 Sep 23;286(38):32962-75. doi: 10.1074/jbc.M111.243899. Epub 2011 Jul 19. Erratum in: *J Biol Chem*. 2015 May 22;290(21):13041. Hammond, Gerald V. R. [Corrected to Hammond, Gerald R. V.]. PMID: 21771783; PMCID: PMC3190942.
- Díaz-Alonso J, Nicoll RA. AMPA receptor trafficking and LTP: Carboxy-termini, amino-termini and TARPs. *Neuropharmacology*. 2021 Oct 1;197:108710. doi: 10.1016/j.neuropharm.2021.108710. Epub 2021 Jul 13. PMID: 34271016; PMCID: PMC9122021.
- Draper JM, Smith CD. Palmitoyl acyltransferase assays and inhibitors (Review). *Mol Membr Biol*. 2009 Jan;26(1):5-13. doi: 10.1080/09687680802683839. Epub 2009 Jan 16. PMID: 19152182; PMCID: PMC2635919.
- Dubue JD, McKinney TL, Treit D, Dickson CT. Intrahippocampal Anisomycin Impairs Spatial Performance on the Morris Water Maze. *J Neurosci*. 2015 Aug 5;35(31):11118-24. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1857-15.2015. PMID: 26245972; PMCID: PMC6605282.
- Ducker CE, Griffel LK, Smith RA, Keller SN, Zhuang Y, Xia Z, Diller JD, Smith CD. Discovery and characterization of inhibitors of human palmitoyl acyltransferases. *Mol Cancer Ther*. 2006 Jul;5(7):1647-59. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0114. PMID: 16891450; PMCID: PMC2888271.
- Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, Zaitsev E, Gold B, Goldman D, Dean M, Lu B, Weinberger DR. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell*. 2003 Jan 24;112(2):257-69. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00035-7. PMID: 12553913.
- El-Husseini Ael-D, Schnell E, Dakoji S, Sweeney N, Zhou Q, Prange O, Gauthier-Campbell C, Aguilera-Moreno A, Nicoll RA, Brecht DS. Synaptic strength regulated by palmitate cycling on PSD-95. *Cell*. 2002 Mar 22;108(6):849-63. doi: 10.1016/s0092-8674(02)00683-9. PMID: 11955437.
- Ernst AM, Syed SA, Zaki O, Bottanelli F, Zheng H, Hacke M, Xi Z, Rivera-Molina F, Graham M, Rebane AA, Björkholm P, Baddeley D, Toomre D, Pincet F, Rothman JE. S-Palmitoylation Sorts Membrane Cargo for Anterograde Transport in the Golgi. *Dev Cell*. 2018 Nov 19;47(4):479-493.e7. doi: 10.1016/j.devcel.2018.10.024. PMID: 30458139; PMCID: PMC6251505.
- Fasshauer D, Bruns D, Shen B, Jahn R, Brünger AT. A structural change occurs upon binding of syntaxin to SNAP-25. *J Biol Chem*. 1997 Feb 14;272(7):4582-90. doi: 10.1074/jbc.272.7.4582. PMID: 9020186.

- Fell J, Axmacher N. The role of phase synchronization in memory processes. *Nat Rev Neurosci*. 2011 Feb;12(2):105-18. doi: 10.1038/nrn2979. PMID: 21248789.
- Fernández-Fernández D, Rosenbrock H, Kroker KS. Inhibition of PDE2A, but not PDE9A, modulates presynaptic short-term plasticity measured by paired-pulse facilitation in the CA1 region of the hippocampus. *Synapse*. 2015 Oct;69(10):484-96. doi: 10.1002/syn.21840. Epub 2015 Jul 29. PMID: 26178667.
- Ferreira A, Han HQ, Greengard P, Kosik KS. Suppression of synapsin II inhibits the formation and maintenance of synapses in hippocampal culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:9225-9229. doi: 10.1073/pnas.92.20.9225
- Figurov A, Pozzo-Miller LD, Olafsson P, Wang T, Lu B. Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus. *Nature*. 1996 Jun 20;381(6584):706-9. doi: 10.1038/381706a0. PMID: 8649517.
- Florian C, Rouillet P. Hippocampal CA3-region is crucial for acquisition and memory consolidation in Morris water maze task in mice. *Behav Brain Res*. 2004 Oct 5;154(2):365-74. doi: 10.1016/j.bbr.2004.03.003. PMID: 15313024.
- Frankland PW, Josselyn SA, Köhler S. The neurobiological foundation of memory retrieval. *Nat Neurosci*. 2019 Oct;22(10):1576-1585. doi: 10.1038/s41593-019-0493-1. Epub 2019 Sep 24. PMID: 31551594; PMCID: PMC6903648.
- Fukata Y, Dimitrov A, Boncompain G, Vielemeyer O, Perez F, Fukata M. Local palmitoylation cycles define activity-regulated postsynaptic subdomains. *J Cell Biol*. 2013 Jul 8;202(1):145-61. doi: 10.1083/jcb.201302071. PMID: 23836932; PMCID: PMC3704990.
- Fukata Y, Fukata M. Protein palmitoylation in neuronal development and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*. 2010 Mar;11(3):161-75. doi: 10.1038/nrn2788. PMID: 20168314.
- Fukata Y, Murakami T, Yokoi N, Fukata M. Local Palmitoylation Cycles and Specialized Membrane Domain Organization. *Curr Top Membr*. 2016;77:97-141. doi: 10.1016/bs.ctm.2015.10.003. Epub 2015 Nov 27. PMID: 26781831.
- Gal-Ben-Ari S, Kenney JW, Ounalla-Saad H, Taha E, David O, Levitan D, Gildish I, Panja D, Pai B, Wibrand K, Simpson TI, Proud CG, Bramham CR, Armstrong JD, Rosenblum K. Consolidation and translation regulation. *Learn Mem*. 2012 Aug 16;19(9):410-22. doi: 10.1101/lm.026849.112. PMID: 22904372; PMCID: PMC3418764.
- Giese KP, Mizuno K. The roles of protein kinases in learning and memory. *Learn Mem*. 2013 Sep 16;20(10):540-52. doi: 10.1101/lm.028449.112. PMID: 24042850.
- Gilbert PE, Brushfield AM. The role of the CA3 hippocampal subregion in spatial memory: a process oriented behavioral assessment. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009 Aug 1;33(5):774-81. doi: 10.1016/j.pnpbp.2009.03.037. Epub 2009 Apr 16. PMID: 19375477; PMCID: PMC2743458.
- Globa AK, Bamji SX. Protein palmitoylation in the development and plasticity of neuronal connections. *Curr Opin Neurobiol*. 2017 Aug;45:210-220. doi: 10.1016/j.conb.2017.02.016. Epub 2017 Mar 30. PMID: 28366531.
- Gómez-Pinilla F, So V, Kesslak JP. Spatial learning induces neurotrophin receptor and synapsin I in the hippocampus. *Brain Res*. 2001 Jun 15;904(1):13-9. doi: 10.1016/s0006-8993(01)02394-0. PMID: 11516407.
- Gooney M, Lynch MA. Long-term potentiation in the dentate gyrus of the rat hippocampus is accompanied by brain-derived neurotrophic factor-induced activation of TrkB. *J Neurochem*. 2001 Jun;77(5):1198-207. doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00334.x. PMID: 11389170.
- Goto A. Synaptic plasticity during systems memory consolidation. *Neurosci Res*. 2022 Oct;183:1-6. doi: 10.1016/j.neures.2022.05.008. Epub 2022 Jun 3. PMID: 35667493.
- Gräff J, Tsai LH. Histone acetylation: molecular mnemonics on the chromatin. *Nat Rev Neurosci*. 2013 Feb;14(2):97-111. doi: 10.1038/nrn3427. Epub 2013 Jan 17. PMID: 23324667.
- Graham L, Collingridge. Long term potentiation in the hippocampus: mechanisms of initiation and modulation by neurotransmitters. *Trends in Pharmacological Sciences*, Volume 6, 1985, Pages 407-411, ISSN 0165-6147. doi: 10.1016/0165-6147(85)90192-0.
- Greaves J, Chamberlain LH. Palmitoylation-dependent protein sorting. *J Cell Biol*. 2007 Jan 29;176(3):249-54. doi: 10.1083/jcb.200610151. Epub 2007 Jan 22. PMID: 17242068; PMCID: PMC2063950.
- Guan H, Middleton SJ, Inoue T, McHugh TJ. Lateralization of CA1 assemblies in the absence of CA3 input. *Nat Commun*. 2021 Oct 20;12(1):6114. doi: 10.1038/s41467-021-26389-3. PMID: 34671042; PMCID: PMC8528853.
- Guan JS, Haggarty SJ, Giacometti E, Dannenberg JH, Joseph N, Gao J, Nieland TJ, Zhou Y, Wang X, Mazitschek R, Bradner JE, DePinho RA, Jaenisch R, Tsai LH. HDAC2 negatively regulates

- memory formation and synaptic plasticity. *Nature*. 2009 May 7;459(7243):55-60. doi: 10.1038/nature07925. PMID: 19424149; PMCID: PMC3498958.
- Guo H, Ali T, Que J, Zhou Y, Bai Y. Dendritic spine dynamics in associative memory: A comprehensive review. *FASEB J*. 2023 May;37(5):e22896. doi: 10.1096/fj.202202166R. PMID: 37000506.
- Guzowski JF, McNaughton BL, Barnes CA, Worley PF. Environment-specific expression of the immediate-early gene *Arc* in hippocampal neuronal ensembles. *Nat Neurosci*. 1999 Dec;2(12):1120-4. doi: 10.1038/16046. PMID: 10570490.
- Hannoush RN. Synthetic protein lipidation. *Curr Opin Chem Biol*. 2015 Oct;28:39-46. doi: 10.1016/j.cbpa.2015.05.025. Epub 2015 Jun 12. PMID: 26080277.
- Hanus C, Schuman EM. Proteostasis in complex dendrites. *Nat Rev Neurosci*. 2013 Sep;14(9):638-48. doi: 10.1038/nrn3546. Epub 2013 Jul 31. PMID: 23900412.
- Hasselmo ME, Eichenbaum H. Hippocampal mechanisms for the context-dependent retrieval of episodes. *Neural Netw*. 2005 Nov;18(9):1172-90. doi: 10.1016/j.neunet.2005.08.007. Epub 2005 Nov 2. PMID: 16263240; PMCID: PMC2253492.
- Hayashi T. Post-translational palmitoylation of ionotropic glutamate receptors in excitatory synaptic functions. *Br J Pharmacol*. 2021 Feb;178(4):784-797. doi: 10.1111/bph.15050. Epub 2020 Apr 7. PMID: 32159240.
- Hayashi Y. Molecular mechanism of hippocampal long-term potentiation - Towards multiscale understanding of learning and memory. *Neurosci Res*. 2022 Feb;175:3-15. doi: 10.1016/j.neures.2021.08.001. Epub 2021 Aug 8. PMID: 34375719.
- Hayashi Y. Molecular mechanism of hippocampal long-term potentiation - Towards multiscale understanding of learning and memory. *Neurosci Res*. 2022 Feb;175:3-15. doi: 10.1016/j.neures.2021.08.001. Epub 2021 Aug 8. PMID: 34375719.
- He J, Gong H, Luo Q. BDNF acutely modulates synaptic transmission and calcium signalling in developing cortical neurons. *Cell Physiol Biochem*. 2005;16(1-3):69-76. doi: 10.1159/000087733. PMID: 16121035.
- Hegde AN. Proteolysis, synaptic plasticity and memory. *Neurobiol Learn Mem*. 2017 Feb;138:98-110. doi: 10.1016/j.nlm.2016.09.003. Epub 2016 Sep 7. PMID: 27614141; PMCID: PMC5336522.
- Heldt SA, Stanek L, Chhatwal JP, Ressler KJ. Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Mol Psychiatry*. 2007 Jul;12(7):656-70. doi: 10.1038/sj.mp.4001957. Epub 2007 Jan 30. PMID: 17264839; PMCID: PMC2442923.
- Hernandez PJ, Abel T. The role of protein synthesis in memory consolidation: progress amid decades of debate. *Neurobiol Learn Mem*. 2008 Mar;89(3):293-311. doi: 10.1016/j.nlm.2007.09.010. Epub 2007 Nov 28. PMID: 18053752; PMCID: PMC2745628.
- Holland SM, Thomas GM. Roles of palmitoylation in axon growth, degeneration and regeneration. *J Neurosci Res*. 2017 Aug;95(8):1528-1539. doi: 10.1002/jnr.24003. Epub 2017 Feb 2. PMID: 28150429; PMCID: PMC5471117.
- Hu D, Zou H, Chen W, Li Y, Luo Z, Wang X, Guo D, Meng Y, Liao F, Wang W, Zhu Y, Wu J, Li G. ZDHHC11 Suppresses Zika Virus Infections by Palmitoylating the Envelope Protein. *Viruses*. 2023 Jan 2;15(1):144. doi: 10.3390/v15010144. PMID: 36680184; PMCID: PMC9863066.
- Hung KL, Wang SJ, Wang YC, Chiang TR, Wang CC. Upregulation of presynaptic proteins and protein kinases associated with enhanced glutamate release from axonal terminals (synaptosomes) of the medial prefrontal cortex in rats with neuropathic pain. *Pain*. 2014 Feb;155(2):377-387. doi: 10.1016/j.pain.2013.10.026. Epub 2013 Nov 8. PMID: 24211726.
- Husseini Ael-D, Bredt DS. Protein palmitoylation: a regulator of neuronal development and function. *Nat Rev Neurosci*. 2002 Oct;3(10):791-802. doi: 10.1038/nrn940. PMID: 12360323.
- Hwang IK, Yoo KY, Jung BK, Cho JH, Kim DH, Kang TC, Kwon YG, Kim YS, Won MH. Correlations between neuronal loss, decrease of memory, and decrease expression of brain-derived neurotrophic factor in the gerbil hippocampus during normal aging. *Exp Neurol*. 2006 Sep;201(1):75-83. doi: 10.1016/j.expneurol.2006.02.129. Epub 2006 May 5. PMID: 16678162.
- Jarome TJ, Helmstetter FJ. Protein degradation and protein synthesis in long-term memory formation. *Front Mol Neurosci*. 2014 Jun 26;7:61. doi: 10.3389/fnmol.2014.00061. PMID: 25018696; PMCID: PMC4072070.
- Jeffery KJ, Morris RG. Cumulative long-term potentiation in the rat dentate gyrus correlates with, but does not modify, performance in the water maze. *Hippocampus*. 1993 Apr;3(2):133-40. doi: 10.1002/hipo.450030205. PMID: 8353600.

- Jennings BC, Nadolski MJ, Ling Y, Baker MB, Harrison ML, Deschenes RJ, Linder ME. 2-Bromopalmitate and 2-(2-hydroxy-5-nitro-benzylidene)-benzo[b]thiophen-3-one inhibit DHHC-mediated palmitoylation in vitro. *J Lipid Res.* 2009 Feb;50(2):233-42. doi: 10.1194/jlr.M800270-JLR200. Epub 2008 Sep 30. PMID: 18827284; PMCID: PMC2636914.
- Jeyifous O, Lin EI, Chen X, Antinone SE, Mastro R, Drisdell R, Reese TS, Green WN. Palmitoylation regulates glutamate receptor distributions in postsynaptic densities through control of PSD95 conformation and orientation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Dec 27;113(52):E8482-E8491. doi: 10.1073/pnas.1612963113. Epub 2016 Dec 12. PMID: 27956638; PMCID: PMC5206547.
- Ji B, Skup M. Roles of palmitoylation in structural long-term synaptic plasticity. *Mol Brain.* 2021 Jan 11;14(1):8. doi: 10.1186/s13041-020-00717-y. PMID: 33430908; PMCID: PMC7802216.
- Jiang H, Zhang X, Chen X, Aramsangtienchai P, Tong Z, Lin H. Protein Lipidation: Occurrence, Mechanisms, Biological Functions, and Enabling Technologies. *Chem Rev.* 2018 Feb 14;118(3):919-988. doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00750. Epub 2018 Jan 2. PMID: 29292991; PMCID: PMC5985209.
- Jin J, Zhi X, Wang X, Meng D. Protein palmitoylation and its pathophysiological relevance. *J Cell Physiol.* 2021 May;236(5):3220-3233. doi: 10.1002/jcp.30122. Epub 2020 Oct 22. PMID: 33094504.
- Josselyn SA, Tonegawa S. Memory engrams: Recalling the past and imagining the future. *Science.* 2020 Jan 3;367(6473):eaaw4325. doi: 10.1126/science.aaw4325. PMID: 31896692; PMCID: PMC7577560.
- Jovanovic JN, Czernik AJ, Fienberg AA, Greengard P, Sihra TS. Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. *Nat Neurosci.* 2000 Apr;3(4):323-9. doi: 10.1038/73888. PMID: 10725920.
- Jovanovic JN, Sihra TS, Nairn AC, Hemmings HC Jr, Greengard P, Czernik AJ. Opposing changes in phosphorylation of specific sites in synapsin I during Ca<sup>2+</sup>-dependent glutamate release in isolated nerve terminals. *J Neurosci.* 2001 Oct 15;21(20):7944-53. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-20-07944.2001. PMID: 11588168; PMCID: PMC6763853.
- Kandel ER, Dudai Y, Mayford MR. The molecular and systems biology of memory. *Cell.* 2014 Mar 27;157(1):163-86. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.001. PMID: 24679534.
- Kandel ER, Pittenger C. The past, the future and the biology of memory storage. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1999 Dec 29;354(1392):2027-52. doi: 10.1098/rstb.1999.0542. PMID: 10670023; PMCID: PMC1692699.
- Kaushik M, Kaushik P, Parvez S. Memory related molecular signatures: The pivots for memory consolidation and Alzheimer's related memory decline. *Ageing Res Rev.* 2022 Apr;76:101577. doi: 10.1016/j.arr.2022.101577. Epub 2022 Jan 29. PMID: 35104629.
- Kim KS, Kim JS, Park JY, Suh YH, Jou I, Joe EH, Park SM. DJ-1 associates with lipid rafts by palmitoylation and regulates lipid rafts-dependent endocytosis in astrocytes. *Hum Mol Genet.* 2013 Dec 1;22(23):4805-17. doi: 10.1093/hmg/ddt332. Epub 2013 Jul 11. PMID: 23847046.
- Korte M, Carroll P, Wolf E, Brem G, Thoenen H, Bonhoeffer T. Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Sep 12;92(19):8856-60. doi: 10.1073/pnas.92.19.8856. PMID: 7568031; PMCID: PMC41066.
- Kovalchuk Y, Hanse E, Kafitz KW, Konnerth A. Postsynaptic Induction of BDNF-Mediated Long-Term Potentiation. *Science.* 2002 Mar 1;295(5560):1729-34. doi: 10.1126/science.1067766. PMID: 11872844.
- Kwon HB, Castillo PE. Long-term potentiation selectively expressed by NMDA receptors at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron.* 2008 Jan 10;57(1):108-20. doi: 10.1016/j.neuron.2007.11.024. PMID: 18184568; PMCID: PMC2390917.
- Lamprecht R, LeDoux J. Structural plasticity and memory. *Nat Rev Neurosci.* 2004 Jan;5(1):45-54. doi: 10.1038/nrn1301. PMID: 14708003.
- Lan T, Delalande C, Dickinson BC. Inhibitors of DHHC family proteins. *Curr Opin Chem Biol.* 2021 Dec;65:118-125. doi: 10.1016/j.cbpa.2021.07.002. Epub 2021 Aug 28. PMID: 34467875; PMCID: PMC8671176.
- Lavenex P, Amaral DG. Hippocampal-neocortical interaction: a hierarchy of associativity. *Hippocampus.* 2000;10(4):420-30. doi: 10.1002/1098-1063(2000)10:4<420::AID-HIPO8>3.0.CO;2-5. PMID: 10985281.
- Leal G, Comprido D, Duarte CB. BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. *Neuropharmacology.* 2014 Jan;76 Pt C:639-56. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.04.005. Epub 2013 Apr 16. PMID: 23602987.
- Lee I, Kesner RP. Differential contribution of NMDA receptors in hippocampal subregions to spatial working memory. *Nat Neurosci.* 2002 Feb;5(2):162-8. doi: 10.1038/nn790. PMID: 11780144.



- Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, Bernard A, Boe AF, Boguski MS, Brockway KS, Byrnes EJ, Chen L, Chen L, Chen TM, Chin MC, Chong J, Crook BE, Czaplinska A, Dang CN, Datta S, Dee NR, Desaki AL, Desta T, Diep E, Dolbeare TA, Donelan MJ, Dong HW, Dougherty JG, Duncan BJ, Ebbert AJ, Eichele G, Estin LK, Faber C, Facer BA, Fields R, Fischer SR, Fliss TP, Frensley C, Gates SN, Glattfelder KJ, Halverson KR, Hart MR, Hohmann JG, Howell MP, Jeung DP, Johnson RA, Karr PT, Kawal R, Kidney JM, Knapik RH, Kuan CL, Lake JH, Laramée AR, Larsen KD, Lau C, Lemon TA, Liang AJ, Liu Y, Luong LT, Michaels J, Morgan JJ, Morgan RJ, Mortrud MT, Mosqueda NF, Ng LL, Ng R, Orta GJ, Overly CC, Pak TH, Parry SE, Pathak SD, Pearson OC, Puchalski RB, Riley ZL, Rockett HR, Rowland SA, Royall JJ, Ruiz MJ, Sarno NR, Schaffnit K, Shapovalova NV, Sivisay T, Slaughterbeck CR, Smith SC, Smith KA, Smith BI, Sotdt AJ, Stewart NN, Stumpf KR, Sunkin SM, Sutram M, Tam A, Teemer CD, Thaller C, Thompson CL, Varnam LR, Visel A, Whitlock RM, Wohnoutka PE, Wolkey CK, Wong VY, Wood M, Yaylaoglu MB, Young RC, Youngstrom BL, Yuan XF, Zhang B, Zwingman TA, Jones AR. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*. 2007 Jan 11;445(7124):168-76. doi: 10.1038/nature05453. Epub 2006 Dec 6. PMID: 17151600.
- Lessmann V, Brigadski T. Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: an update. *Neurosci Res*. 2009 Sep;65(1):11-22. doi: 10.1016/j.neures.2009.06.004. Epub 2009 Jun 11. Erratum in: *Neurosci Res*. 2009 Nov;65(3):316-7. PMID: 19523993.
- Levental I, Lingwood D, Grzybek M, Coskun U, Simons K. Palmitoylation regulates raft affinity for the majority of integral raft proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Dec 21;107(51):22050-4. doi: 10.1073/pnas.1016184107. Epub 2010 Dec 3. PMID: 21131568; PMCID: PMC3009825.
- Li J, Wang T, Xia J, Yao W, Huang F. Enzymatic and nonenzymatic protein acetylations control glycolysis process in liver diseases. *FASEB J*. 2019 Nov;33(11):11640-11654. doi: 10.1096/fj.201901175R. Epub 2019 Aug 1. PMID: 31370704; PMCID: PMC6902721.
- Li Y, Hu J, Höfer K, Wong AM, Cooper JD, Birnbaum SG, Hammer RE, Hofmann SL. 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*. 2010 Apr 23;285(17):13022-31. doi: 10.1074/jbc.M109.079426. Epub 2010 Feb 22. PMID: 20178993; PMCID: PMC2857114.
- Lin DT, Conibear E. Enzymatic protein depalmitoylation by acyl protein thioesterases. *Biochem Soc Trans*. 2015 Apr;43(2):193-8. doi: 10.1042/BST20140235. PMID: 25849916.
- Lin X, Amalraj M, Blanton C, Avila B, Holmes TC, Nitz DA, Xu X. Noncanonical projections to the hippocampal CA3 regulate spatial learning and memory by modulating the feedforward hippocampal trisynaptic pathway. *PLoS Biol*. 2021 Dec 20;19(12):e3001127. doi: 10.1371/journal.pbio.3001127. PMID: 34928938; PMCID: PMC8741299.
- Linder ME, Deschenes RJ. Palmitoylation: policing protein stability and traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Jan;8(1):74-84. doi: 10.1038/nrm2084. PMID: 17183362.
- Lisman JE, Zhabotinsky AM. A model of synaptic memory: a CaMKII/PP1 switch that potentiates transmission by organizing an AMPA receptor anchoring assembly. *Neuron*. 2001 Aug 2;31(2):191-201. doi: 10.1016/s0896-6273(01)00364-6. PMID: 11502252.
- Llinás R, Gruner JA, Sugimori M, McGuinness TL, Greengard P. Regulation by synapsin I and Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II of the transmitter release in squid giant synapse. *J Physiol*. 1991 May;436:257-82. doi: 10.1113/jphysiol.1991.sp018549. PMID: 1676419; PMCID: PMC1181504.
- Lussier MP, Sanz-Clemente A, Roche KW. Dynamic Regulation of N-Methyl-d-aspartate (NMDA) and  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid (AMPA) Receptors by Posttranslational Modifications. *J Biol Chem*. 2015 Nov 27;290(48):28596-603. doi: 10.1074/jbc.R115.652750. Epub 2015 Oct 9. PMID: 26453298; PMCID: PMC4661374.
- Luza S, Opazo CM, Bousman CA, Pantelis C, Bush AI, Everall IP. The ubiquitin proteasome system and schizophrenia. *Lancet Psychiatry*. 2020 Jun;7(6):528-537. doi: 10.1016/S2215-0366(19)30520-6. Epub 2020 Feb 12. PMID: 32061320.
- Mabb AM, Ehlers MD. Arc ubiquitination in synaptic plasticity. *Semin Cell Dev Biol*. 2018 May;77:10-16. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.09.009. Epub 2017 Sep 7. PMID: 28890418.
- Malenka RC, Nicoll RA. Long-term potentiation--a decade of progress? *Science*. 1999 Sep 17;285(5435):1870-4. doi: 10.1126/science.285.5435.1870. PMID: 10489359.
- Marmorstein R, Zhou MM. Writers and readers of histone acetylation: structure, mechanism, and inhibition. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014 Jul 1;6(7):a018762. doi: 10.1101/cshperspect.a018762. PMID: 24984779; PMCID: PMC4067988.

- Martin SJ, Grimwood PD, Morris RG. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci.* 2000;23:649-711. doi: 10.1146/annurev.neuro.23.1.649. PMID: 10845078.
- Martin SJ, Morris RG. New life in an old idea: the synaptic plasticity and memory hypothesis revisited. *Hippocampus.* 2002;12(5):609-36. doi: 10.1002/hipo.10107. PMID: 12440577.
- Matsumoto T, Rauskolb S, Polack M, Klose J, Kolbeck R, Korte M, Barde YA. Biosynthesis and processing of endogenous BDNF: CNS neurons store and secrete BDNF, not pro-BDNF. *Nat Neurosci.* 2008 Feb;11(2):131-3. doi: 10.1038/nn2038. Epub 2008 Jan 20. PMID: 18204444.
- Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GC, Kasai H. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature.* 2004 Jun 17;429(6993):761-6. doi: 10.1038/nature02617. Epub 2004 Jun 9. PMID: 15190253; PMCID: PMC4158816.
- Matt L, Kim K, Chowdhury D, Hell JW. Role of Palmitoylation of Postsynaptic Proteins in Promoting Synaptic Plasticity. *Front Mol Neurosci.* 2019 Jan 31;12:8. doi: 10.3389/fnmol.2019.00008. PMID: 30766476; PMCID: PMC6365469.
- McGaugh JL. Memory--a century of consolidation. *Science.* 2000 Jan 14;287(5451):248-51. doi: 10.1126/science.287.5451.248. PMID: 1063477.
- Mednick SC, Cai DJ, Shuman T, Anagnostaras S, Wixted JT. An opportunistic theory of cellular and systems consolidation. *Trends Neurosci.* 2011 Oct;34(10):504-14. doi: 10.1016/j.tins.2011.06.003. Epub 2011 Aug 20. PMID: 21742389; PMCID: PMC3183157.
- Meis S, Endres T, Lessmann V. Postsynaptic BDNF signalling regulates long-term potentiation at thalamo-amygdala afferents. *J Physiol.* 2012 Jan 1;590(1):193-208. doi: 10.1111/jphysiol.2011.220434. Epub 2011 Nov 14. PMID: 22083603; PMCID: PMC3300056.
- Meng L, Zou L, Xiong M, Chen J, Zhang X, Yu T, Li Y, Liu C, Chen G, Wang Z, Ye K, Zhang Z. A synapsin I cleavage fragment contributes to synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Aging Cell.* 2022 May;21(5):e13619. doi: 10.1111/acer.13619. Epub 2022 Apr 20. PMID: 35443102; PMCID: PMC9124304.
- Milnerwood AJ, Parsons MP, Young FB, Singaraja RR, Franciosi S, Volta M, Bergeron S, Hayden MR, Raymond LA. Memory and synaptic deficits in Hip14/DHHC17 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Dec 10;110(50):20296-301. doi: 10.1073/pnas.1222384110. Epub 2013 Nov 25. PMID: 24277827; PMCID: PMC3864353.
- Minichiello L. TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nat Rev Neurosci.* 2009 Dec;10(12):850-60. doi: 10.1038/nrn2738. PMID: 19927149.
- Mitchell DA, Vasudevan A, Linder ME, Deschenes RJ. Protein palmitoylation by a family of DHHC protein S-acyltransferases. *J Lipid Res.* 2006 Jun;47(6):1118-27. doi: 10.1194/jlr.R600007-JLR200. Epub 2006 Apr 1. PMID: 16582420.
- Mizuno M, Yamada K, He J, Nakajima A, Nabeshima T. Involvement of BDNF receptor TrkB in spatial memory formation. *Learn Mem.* 2003 Mar-Apr;10(2):108-15. doi: 10.1101/lm.56003. PMID: 12663749; PMCID: PMC196664.
- Mizuno M, Yamada K, Maekawa N, Saito K, Seishima M, Nabeshima T. CREB phosphorylation as a molecular marker of memory processing in the hippocampus for spatial learning. *Behav Brain Res.* 2002 Jul 18;133(2):135-41. doi: 10.1016/s0166-4328(01)00470-3. PMID: 12110446.
- Mizuno M, Yamada K, Takei N, Tran MH, He J, Nakajima A, Nawa H, Nabeshima T. Phosphatidylinositol 3-kinase: a molecule mediating BDNF-dependent spatial memory formation. *Mol Psychiatry.* 2003 Feb;8(2):217-24. doi: 10.1038/sj.mp.4001215. PMID: 12610654.
- Molteni R, Barnard RJ, Ying Z, Roberts CK, Gómez-Pinilla F. A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning. *Neuroscience.* 2002;112(4):803-14. doi: 10.1016/s0306-4522(02)00123-9. PMID: 12088740.
- Montersino A, Thomas GM. Slippery signaling: Palmitoylation-dependent control of neuronal kinase localization and activity. *Mol Membr Biol.* 2015 Aug-Dec;32(5-8):179-88. doi: 10.1080/09687688.2016.1182652. Epub 2016 May 31. PMID: 27241460; PMCID: PMC5002227.
- Montkowski A, Holsboer F. Intact spatial learning and memory in transgenic mice with reduced BDNF. *Neuroreport.* 1997 Feb 10;8(3):779-82. doi: 10.1097/00001756-199702100-00040. PMID: 9106766.
- Morgado-Bernal I. Learning and memory consolidation: linking molecular and behavioral data. *Neuroscience.* 2011 Mar 10;176:12-9. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.12.056. Epub 2011 Jan 5. PMID: 21215299.
- Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods.* 1984 May;11(1):47-60. doi: 10.1016/0165-0270(84)90007-4. PMID: 6471907.

- Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*. 1986 Feb 27-Mar 5;319(6056):774-6. doi: 10.1038/319774a0. PMID: 2869411.
- 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. doi: 10.1038/297681a0. PMID: 7088155.
- Morris RG. NMDA receptors and memory encoding. *Neuropharmacology*. 2013 Nov;74:32-40. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.04.014. Epub 2013 Apr 27. PMID: 23628345.
- Mukai K, Konno H, Akiba T, Uemura T, Waguri S, Kobayashi T, Barber GN, Arai H, Taguchi T. Activation of STING requires palmitoylation at the Golgi. *Nat Commun*. 2016 Jun 21;7:11932. doi: 10.1038/ncomms11932. PMID: 27324217; PMCID: PMC4919521.
- Mumby SM. Reversible palmitoylation of signaling proteins. *Curr Opin Cell Biol*. 1997 Apr;9(2):148-54. doi: 10.1016/s0955-0674(97)80056-7. PMID: 9069258.
- Nader K. Memory traces unbound. *Trends Neurosci*. 2003 Feb;26(2):65-72. doi: 10.1016/S0166-2236(02)00042-5. PMID: 12536129.
- Nadolski MJ, Linder ME. Protein lipidation. *FEBS J*. 2007 Oct;274(20):5202-10. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.06056.x. Epub 2007 Sep 24. PMID: 17892486.
- Nakazawa K, McHugh TJ, Wilson MA, Tonegawa S. NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory. *Nat Rev Neurosci*. 2004 May;5(5):361-72. doi: 10.1038/nrn1385. PMID: 15100719.
- Nakazawa K, Quirk MC, Chitwood RA, Watanabe M, Yeckel MF, Sun LD, Kato A, Carr CA, Johnston D, Wilson MA, Tonegawa S. Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative memory recall. *Science*. 2002 Jul 12;297(5579):211-8. doi: 10.1126/science.1071795. Epub 2002 May 30. PMID: 12040087; PMCID: PMC2877140
- Nekooki-Machida Y, Hagiwara H. Role of tubulin acetylation in cellular functions and diseases. *Med Mol Morphol*. 2020 Dec;53(4):191-197. doi: 10.1007/s00795-020-00260-8. Epub 2020 Jul 6. PMID: 32632910.
- Neves G, Cooke SF, Bliss TV. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci*. 2008 Jan;9(1):65-75. doi: 10.1038/nrn2303. Erratum in: *Nat Rev Neurosci*. 2012 Dec;13(12):878. PMID: 18094707.
- Nguyen PV, Kandel ER. A macromolecular synthesis-dependent late phase of long-term potentiation requiring cAMP in the medial perforant pathway of rat hippocampal slices. *J Neurosci*. 1996 May 15;16(10):3189-98. doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-10-03189.1996. PMID: 8627357; PMCID: PMC6579127.
- Nicoll RA, Schmitz D. Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nat Rev Neurosci*. 2005 Nov;6(11):863-76. doi: 10.1038/nrn1786. PMID: 16261180.
- Noland CL, Gierke S, Schnier PD, Murray J, Sandoval WN, Sagolla M, Dey A, Hannoush RN, Fairbrother WJ, Cunningham CN. Palmitoylation of TEAD Transcription Factors Is Required for Their Stability and Function in Hippo Pathway Signaling. *Structure*. 2016 Jan 5;24(1):179-186. doi: 10.1016/j.str.2015.11.005. Epub 2015 Dec 24. PMID: 26724994.
- Noritake J, Fukata Y, Iwanaga T, Hosomi N, Tsutsumi R, Matsuda N, Tani H, Iwanari H, Mochizuki Y, Kodama T, Matsuura Y, Brecht DS, Hamakubo T, Fukata M. Mobile DHHC palmitoylating enzyme mediates activity-sensitive synaptic targeting of PSD-95. *J Cell Biol*. 2009 Jul 13;186(1):147-60. doi: 10.1083/jcb.200903101. PMID: 19596852; PMCID: PMC2712995.
- Norris D. Short-term memory and long-term memory are still different. *Psychol Bull*. 2017 Sep;143(9):992-1009. doi: 10.1037/bul0000108. Epub 2017 May 22. PMID: 28530428; PMCID: PMC5578362.
- O'Keefe J, Dostrovsky J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res*. 1971 Nov;34(1):171-5. doi: 10.1016/0006-8993(71)90358-1. PMID: 5124915.
- Okuyama T, Kitamura T, Roy DS, Itohara S, Tonegawa S. Ventral CA1 neurons store social memory. *Science*. 2016 Sep 30;353(6307):1536-1541. doi: 10.1126/science.aaf7003. PMID: 27708103; PMCID: PMC5493325.
- Oota-Ishigaki A, Takao K, Yamada D, Sekiguchi M, Itoh M, Koshidata Y, Abe M, Natsume R, Kaneko M, Adachi T, Kaizuka T, Suzuki N, Sakimura K, Okuno H, Wada K, Mishina M, Miyakawa T, Hayashi T. Prolonged contextual fear memory in AMPA receptor palmitoylation-deficient mice.
- Ou LC, Gean PW. Regulation of amygdala-dependent learning by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol-3-kinase. *Neuropsychopharmacology*. 2006 Feb;31(2):287-96. doi: 10.1038/sj.npp.1300830. PMID: 16034442.

- Ou LC, Gean PW. Transcriptional regulation of brain-derived neurotrophic factor in the amygdala during consolidation of fear memory. *Mol Pharmacol*. 2007 Aug;72(2):350-8. doi: 10.1124/mol.107.034934. Epub 2007 Apr 24. PMID: 17456785.
- Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S, Teng KK, Yung WH, Hempstead BL, Lu B. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science*. 2004 Oct 15;306(5695):487-91. doi: 10.1126/science.1100135. PMID: 15486301.
- Papaleo F, Silverman JL, Aney J, Tian Q, Barkan CL, Chadman KK, Crawley JN. Working memory deficits, increased anxiety-like traits, and seizure susceptibility in BDNF overexpressing mice. *Learn Mem*. 2011 Jul 26;18(8):534-44. doi: 10.1101/lm.2213711. PMID: 21791566; PMCID: PMC3256571.
- Patterson SL, Abel T, Deuel TA, Martin KC, Rose JC, Kandel ER. Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron*. 1996 Jun;16(6):1137-45. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80140-3. PMID: 8663990.
- Paxinos G, Watson C. (1996). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, New York, third edition.
- Peleg S, Sananbenesi F, Zovoilis A, Burkhardt S, Bahari-Javan S, Agis-Balboa RC, Cota P, Wittnam JL, Gogol-Doering A, Opitz L, Salinas-Riester G, Dettenhofer M, Kang H, Farinelli L, Chen W, Fischer A. Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice. *Science*. 2010 May 7;328(5979):753-6. doi: 10.1126/science.1186088. Erratum in: *Science*. 2010 Jun 25;328(5986):1634. PMID: 20448184.
- Penzen P, Cahill ME, Jones KA, Srivastava DP. Convergent CaMK and RacGEF signals control dendritic structure and function. *Trends Cell Biol*. 2008 Sep;18(9):405-13. doi: 10.1016/j.tcb.2008.07.002. Epub 2008 Aug 11. PMID: 18701290.
- Perusini JN, Cajigas SA, Cohensedgh O, Lim SC, Pavlova IP, Donaldson ZR, Denny CA. Optogenetic stimulation of dentate gyrus engrams restores memory in Alzheimer's disease mice. *Hippocampus*. 2017 Oct;27(10):1110-1122. doi: 10.1002/hipo.22756. Epub 2017 Jul 20. PMID: 28667669; PMCID: PMC5610644.
- Petzold A, Psotta L, Brigadski T, Endres T, Lessmann V. Chronic BDNF deficiency leads to an age-dependent impairment in spatial learning. *Neurobiol Learn Mem*. 2015 Apr;120:52-60. doi: 10.1016/j.nlm.2015.02.009. Epub 2015 Feb 24. PMID: 25724412.
- Pfeiffer BE, Foster DJ. Hippocampal place-cell sequences depict future paths to remembered goals. *Nature*. 2013 May 2;497(7447):74-9. doi: 10.1038/nature12112. Epub 2013 Apr 17. PMID: 23594744; PMCID: PMC3990408.
- Philippe JM, Jenkins PM. Spatial organization of palmitoyl acyl transferases governs substrate localization and function. *Mol Membr Biol*. 2019 Dec;35(1):60-75. doi: 10.1080/09687688.2019.1710274. PMID: 31969037; PMCID: PMC7031816.
- Pilly PK, Grossberg S. How do spatial learning and memory occur in the brain? Coordinated learning of entorhinal grid cells and hippocampal place cells. *J Cogn Neurosci*. 2012 May;24(5):1031-54. doi: 10.1162/jocn\_a\_00200. Epub 2012 Jan 30. PMID: 22288394.
- Pothuizen HH, Zhang WN, Jongen-Rêlo AL, Feldon J, Yee BK. Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: a within-subject, within-task comparison of reference and working spatial memory. *Eur J Neurosci*. 2004 Feb;19(3):705-12. doi: 10.1111/j.0953-816x.2004.03170.x. PMID: 14984421.
- Prescott GR, Gorleku OA, Greaves J, Chamberlain LH. Palmitoylation of the synaptic vesicle fusion machinery. *J Neurochem*. 2009 Aug;110(4):1135-49. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06205.x. Epub 2009 Jun 5. PMID: 19508429.
- Quach D, Vitali C, La FM, Xiao AX, Millar JS, Tang C, Rader DJ, Phillips MC, Lyssenko NN. Cell lipid metabolism modulators 2-bromopalmitate, D609, monensin, U18666A and probucol shift discoidal HDL formation to the smaller-sized particles: implications for the mechanism of HDL assembly. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Dec;1861(12 Pt A):1968-1979. doi: 10.1016/j.bbailip.2016.09.017. Epub 2016 Sep 24. PMID: 27671775.
- Rajasethupathy P, Fiumara F, Sheridan R, Betel D, Puthanveetil SV, Russo JJ, Sander C, Tuschl T, Kandel E. Characterization of small RNAs in *Aplysia* reveals a role for miR-124 in constraining synaptic plasticity through CREB. *Neuron*. 2009 Sep 24;63(6):803-17. doi: 10.1016/j.neuron.2009.05.029. PMID: 19778509; PMCID: PMC2875683.
- Ramazi S, Zahiri J. Posttranslational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods. *Database (Oxford)*. 2021 Apr 7;2021:baab012. doi: 10.1093/database/baab012. PMID: 33826699; PMCID: PMC8040245.
- Ramirez-Mejia G, Gil-Lievana E, Urrego-Morales O, Soto-Reyes E, Bermúdez-Rattoni F. Class I HDAC inhibition improves object recognition memory consolidation through BDNF/TrkB

- pathway in a time-dependent manner. *Neuropharmacology*. 2021 Apr 1;187:108493. doi: 10.1016/j.neuropharm.2021.108493. Epub 2021 Feb 11. PMID: 33581144.
- Raven F, Bolsius YG, van Renssen LV, Meijer EL, van der Zee EA, Meerlo P, Havekes R. Elucidating the role of protein synthesis in hippocampus-dependent memory consolidation across the day and night. *Eur J Neurosci*. 2021 Oct;54(8):6972-6981. doi: 10.1111/ejn.14684. Epub 2020 Feb 3. PMID: 31965655; PMCID: PMC8596627.
- Reily C, Stewart TJ, Renfrow MB, Novak J. Glycosylation in health and disease. *Nat Rev Nephrol*. 2019 Jun;15(6):346-366. doi: 10.1038/s41581-019-0129-4. PMID: 30858582; PMCID: PMC6590709.
- Reiner A, Levitz J. Glutamatergic Signaling in the Central Nervous System: Ionotropic and Metabotropic Receptors in Concert. *Neuron*. 2018 Jun 27;98(6):1080-1098. doi: 10.1016/j.neuron.2018.05.018. PMID: 29953871; PMCID: PMC6484838.
- Resende LS, Ribeiro AM, Werner D, Hall JM, Savage LM. Thiamine deficiency degrades the link between spatial behavior and hippocampal synapsin I and phosphorylated synapsin I protein levels. *Behav Brain Res*. 2012 Jul 1;232(2):421-5. doi: 10.1016/j.bbr.2012.04.004. Epub 2012 Apr 9. PMID: 22507301; PMCID: PMC5113826.
- Resh MD. Covalent lipid modifications of proteins. *Curr Biol*. 2013 May 20;23(10):R431-5. doi: 10.1016/j.cub.2013.04.024. PMID: 23701681; PMCID: PMC3712495
- Resh MD. Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Aug 12;1451(1):1-16. doi: 10.1016/s0167-4889(99)00075-0. PMID: 10446384.
- Rose CR, Blum R, Kafitz KW, Kovalchuk Y, Konnerth A. From modulator to mediator: rapid effects of BDNF on ion channels. *Bioessays*. 2004 Nov;26(11):1185-94. doi: 10.1002/bies.20118. PMID: 15499580.
- Rosenberg T, Gal-Ben-Ari S, Dieterich DC, Kreutz MR, Ziv NE, Gundelfinger ED, Rosenblum K. The roles of protein expression in synaptic plasticity and memory consolidation. *Front Mol Neurosci*. 2014 Nov 12;7:86. doi: 10.3389/fnmol.2014.00086. PMID: 25429258; PMCID: PMC4228929.
- Rosenegger D, Parvez K, Lukowiak K. Enhancing memory formation by altering protein phosphorylation balance. *Neurobiol Learn Mem*. 2008 Oct;90(3):544-52. doi: 10.1016/j.nlm.2008.06.005. Epub 2008 Jul 26. PMID: 18625329.
- Rossato JI, Bevilacqua LR, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. Retrieval induces hippocampal-dependent reconsolidation of spatial memory. *Learn Mem*. 2006 Jul-Aug;13(4):431-40. doi: 10.1101/lm.315206. PMID: 16882860; PMCID: PMC1538920.
- Roy DS, Arons A, Mitchell TI, Pignatelli M, Ryan TJ, Tonegawa S. Memory retrieval by activating engram cells in mouse models of early Alzheimer's disease. *Nature*. 2016 Mar 24;531(7595):508-12. doi: 10.1038/nature17172. Epub 2016 Mar 16. PMID: 26982728; PMCID: PMC4847731.
- SAGARPA secretaria de agricultura, Ganaderia, 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*.
- Saha RN, Dudek SM. Splitting hares and tortoises: a classification of neuronal immediate early gene transcription based on poised RNA polymerase II. *Neuroscience*. 2013 Sep 5;247:175-81. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.04.064. Epub 2013 May 24. PMID: 23711585; PMCID: PMC3722259.
- Sambataro F, Pennuto M. Post-translational Modifications and Protein Quality Control in Motor Neuron and Polyglutamine Diseases. *Front Mol Neurosci*. 2017 Mar 31;10:82. doi: 10.3389/fnmol.2017.00082. PMID: 28408866; PMCID: PMC5374214.
- Sanders SS, Martin DD, Butland SL, Lavallée-Adam M, Calzolari D, Kay C, Yates JR 3rd, Hayden MR. Curation of the Mammalian Palmitoylome Indicates a Pivotal Role for Palmitoylation in Diseases and Disorders of the Nervous System and Cancers. *PLoS Comput Biol*. 2015 Aug 14;11(8):e1004405. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004405. PMID: 26275289; PMCID: PMC4537140.
- Santi S, Cappello S, Riccio M, Bergami M, Aicardi G, Schenk U, Matteoli M, Canossa M. Hippocampal neurons recycle BDNF for activity-dependent secretion and LTP maintenance. *EMBO J*. 2006 Sep 20;25(18):4372-80. doi: 10.1038/sj.emboj.7601303. Epub 2006 Sep 7. PMID: 16957779; PMCID: PMC1570444.
- Schiebler W, Jahn R, Doucet JP, Rothlein J, Greengard P. Characterization of synapsin I binding to small synaptic vesicles. *J Biol Chem*. 1986 Jun 25;261(18):8383-90. Erratum in: *J Biol Chem* 1986 Sep 15;261(26):12428. PMID: 3087973.

- Schmid B, Rippmann JF, Tadayyon M, Hamilton BS. Inhibition of fatty acid synthase prevents preadipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Mar 25;328(4):1073-82. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.01.067. PMID: 15707987.
- Schwartz JH. Ubiquitination, protein turnover, and long-term synaptic plasticity. *Sci STKE*. 2003 Jul 8;2003(190):pe26. doi: 10.1126/stke.2003.190.pe26. PMID: 12855772.
- Scott-Solomon E, Kuruvilla R. Mechanisms of neurotrophin trafficking via Trk receptors. *Mol Cell Neurosci*. 2018 Sep;91:25-33. doi: 10.1016/j.mcn.2018.03.013. Epub 2018 Mar 27. PMID: 29596897; PMCID: PMC6128733.
- Shahid M, Kim M, Jin P, Zhou B, Wang Y, Yang W, You S, Kim J. S-Palmitoylation as a Functional Regulator of Proteins Associated with Cisplatin Resistance in Bladder Cancer. *Int J Biol Sci*. 2020 Jul 19;16(14):2490-2505. doi: 10.7150/ijbs.45640. PMID: 32792852; PMCID: PMC7415425.
- Shahoha M, Cohen R, Ben-Simon Y, Ashery U. cAMP-Dependent Synaptic Plasticity at the Hippocampal Mossy Fiber Terminal. *Front Synaptic Neurosci*. 2022 Apr 4;14:861215. doi: 10.3389/fnsyn.2022.861215. PMID: 35444523; PMCID: PMC9013808.
- Shastri L. Episodic memory and cortico-hippocampal interactions. *Trends Cogn Sci*. 2002 Apr 1;6(4):162-168. doi: 10.1016/s1364-6613(02)01868-5. PMID: 11912039.
- Sheehan P, Zhu M, Beskow A, Vollmer C, Waites CL. Activity-Dependent Degradation of Synaptic Vesicle Proteins Requires Rab35 and the ESCRT Pathway. *J Neurosci*. 2016 Aug 17;36(33):8668-86. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0725-16.2016. PMID: 27535913; PMCID: PMC4987437.
- Shih PC, Yang YR, Wang RY. Effects of exercise intensity on spatial memory performance and hippocampal synaptic plasticity in transient brain ischemic rats. *PLoS One*. 2013 Oct 25;8(10):e78163. doi: 10.1371/journal.pone.0078163. PMID: 24205142; PMCID: PMC3808358.
- Shimell JJ, Globa A, Sepers MD, Wild AR, Matin N, Raymond LA, Bamji SX. Regulation of hippocampal excitatory synapses by the Zdhhc5 palmitoyl acyltransferase. *J Cell Sci*. 2021 May 1;134(9):jcs254276. doi: 10.1242/jcs.254276. Epub 2021 May 11. PMID: 33758079; PMCID: PMC8182408.
- Shors TJ, Matzel LD. Long-term potentiation: what's learning got to do with it? *Behav Brain Sci*. 1997 Dec;20(4):597-614; discussion 614-55. doi: 10.1017/s0140525x97001593. PMID: 10097007.
- Shvedunova M, Akhtar A. Modulation of cellular processes by histone and non-histone protein acetylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2022 May;23(5):329-349. doi: 10.1038/s41580-021-00441-y. Epub 2022 Jan 18. PMID: 35042977.
- Singh BN, Zhang G, Hwa YL, Li J, Dowdy SC, Jiang SW. Nonhistone protein acetylation as cancer therapy targets. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2010 Jun;10(6):935-54. doi: 10.1586/era.10.62. PMID: 20553216; PMCID: PMC3273412.
- Slaughter MJ, Shanle EK, Khan A, Chua KF, Hong T, Boxer LD, Allis CD, Josefowicz SZ, Garcia BA, Rothbart SB, Strahl BD, Davis IJ. HDAC inhibition results in widespread alteration of the histone acetylation landscape and BRD4 targeting to gene bodies. *Cell Rep*. 2021 Jan 19;34(3):108638. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108638. PMID: 33472068; PMCID: PMC7886050.
- Smith BJ, Carregari VC. Post-Translational Modifications During Brain Development. *Adv Exp Med Biol*. 2022;1382:29-38. doi: 10.1007/978-3-031-05460-0\_3. PMID: 36029402.
- Smith SM. Environmental context-dependent recognition memory using a short-term memory task for input. *Mem Cognit*. 1986 Jul;14(4):347-54. doi: 10.3758/bf03202513. PMID: 3762389.
- Sohn H, Park M. Palmitoylation-mediated synaptic regulation of AMPA receptor trafficking and function. *Arch Pharm Res*. 2019 May;42(5):426-435. doi: 10.1007/s12272-019-01134-z. Epub 2019 Mar 5. PMID: 30838509; PMCID: PMC6505502.
- Spacek J, Harris KM. Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat. *J Neurosci*. 1997 Jan 1;17(1):190-203. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-01-00190.1997. PMID: 8987748; PMCID: PMC6793680.
- Spinelli M, Fusco S, Mainardi M, Scala F, Natale F, Lapenta R, Mattera A, Rinaudo M, Li Puma DD, Ripoli C, Grassi A, D'Ascenzo M, Grassi C. Brain insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and memory by increasing GluA1 palmitoylation through FoxO3a. *Nat Commun*. 2017 Dec 8;8(1):2009. doi: 10.1038/s41467-017-02221-9. PMID: 29222408; PMCID: PMC5722929.

- Squire LR, Genzel L, Wixted JT, Morris RG. Memory consolidation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015 Aug 3;7(8):a021766. doi: 10.1101/cshperspect.a021766. PMID: 26238360; PMCID: PMC4526749.
- Steele RJ, Morris RG. Delay-dependent impairment of a matching-to-place task with chronic and intrahippocampal infusion of the NMDA-antagonist D-AP5. *Hippocampus.* 1999;9(2):118-36. doi: 10.1002/(SICI)1098-1063(1999)9:2<118::AID-HIPO4>3.0.CO;2-8. PMID: 10226773.
- Stefanko DP, Barrett RM, Ly AR, Reolon GK, Wood MA. Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Jun 9;106(23):9447-52. doi: 10.1073/pnas.0903964106. Epub 2009 May 26. PMID: 19470462; PMCID: PMC2695069.
- Sun C, Nold A, Fusco CM, Rangaraju V, Tchumatchenko T, Heilemann M, Schuman EM. The prevalence and specificity of local protein synthesis during neuronal synaptic plasticity. *Sci Adv.* 2021 Sep 17;7(38):eabj0790. doi: 10.1126/sciadv.abj0790. Epub 2021 Sep 17. PMID: 34533986; PMCID: PMC8448450.
- Sun W, Cheng H, Yang Y, Tang D, Li X, An L. Requirements of Postnatal proBDNF in the Hippocampus for Spatial Memory Consolidation and Neural Function. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Jul 15;9:678182. doi: 10.3389/fcell.2021.678182. PMID: 34336832; PMCID: PMC8319730.
- Sunyer B, Diao W, Lubec G. The role of post-translational modifications for learning and memory formation. *Electrophoresis.* 2008 Jun;29(12):2593-602. doi: 10.1002/elps.200700791. PMID: 18494028
- Sutton MA, Schuman EM. Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory. *Cell.* 2006 Oct 6;127(1):49-58. doi: 10.1016/j.cell.2006.09.014. PMID: 17018276.
- Sweatt JD. Memory mechanisms: the yin and yang of protein phosphorylation. *Curr Biol.* 2001 May 15;11(10):R391-4. doi: 10.1016/s0960-9822(01)00216-0. PMID: 11378403.
- Tai HC, Schuman EM. Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction. *Nat Rev Neurosci.* 2008 Nov;9(11):826-38. doi: 10.1038/nrn2499. PMID: 18931696.
- Tanaka KZ, Pevzner A, Hamidi AB, Nakazawa Y, Graham J, Wiltgen BJ. Cortical representations are reinstated by the hippocampus during memory retrieval. *Neuron.* 2014 Oct 22;84(2):347-54. doi: 10.1016/j.neuron.2014.09.037. Epub 2014 Oct 9. PMID: 25308331.
- Tang Y, Zhao W, Chen Y, Zhao Y, Gu W. Acetylation is indispensable for p53 activation. *Cell.* 2008 May 16;133(4):612-26. doi: 10.1016/j.cell.2008.03.025. Erratum in: *Cell.* 2008 Jun 27;133(7):1290. PMID: 18485870; PMCID: PMC2914560.
- Tao-Cheng JH, Dosemeci A, Winters CA, Reese TS. Changes in the distribution of calcium calmodulin-dependent protein kinase II at the presynaptic bouton after depolarization. *Brain Cell Biol.* 2006 Jun;35(2-3):117-24. doi: 10.1007/s11068-007-9012-5. Epub 2007 Sep 20. PMID: 17957478.
- Thiel G. Synapsin I, synapsin II, and synaptophysin: marker proteins of synaptic vesicles. *Brain Pathol.* 1993 Jan;3(1):87-95. doi: 10.1111/j.1750-3639.1993.tb00729.x. PMID: 7903586.
- Thomas GM, Hayashi T, Chiu SL, Chen CM, Hagan RL. Palmitoylation by DHHC5/8 targets GRIP1 to dendritic endosomes to regulate AMPA-R trafficking. *Neuron.* 2012 Feb 9;73(3):482-96. doi: 10.1016/j.neuron.2011.11.021. PMID: 22325201; PMCID: PMC3345505.
- Thomas GM, Hagan RL. Palmitoylation-dependent regulation of glutamate receptors and their PDZ domain-containing partners. *Biochem Soc Trans.* 2013 Feb 1;41(1):72-8. doi: 10.1042/BST20120223. PMID: 23356261; PMCID: PMC3829716.
- Tonegawa S, Pignatelli M, Roy DS, Ryan TJ. Memory engram storage and retrieval. *Curr Opin Neurobiol.* 2015 Dec;35:101-9. doi: 10.1016/j.conb.2015.07.009. Epub 2015 Aug 14. PMID: 26280931.
- Towler D, Glaser L. Acylation of cellular proteins with endogenously synthesized fatty acids. *Biochemistry.* 1986 Feb 25;25(4):878-84. doi: 10.1021/bi00352a021. PMID: 3964651.
- Towler Narayana VK, Tomatis VM, Wang T, Kvaskoff D, Meunier FA. Profiling of Free Fatty Acids Using Stable Isotope Tagging Uncovers a Role for Saturated Fatty Acids in Neuroexocytosis. *Chem Biol.* 2015 Nov 19;22(11):1552-1561. doi: 10.1016/j.chembiol.2015.09.010. Epub 2015 Oct 22. PMID: 26601652.
- Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev.* 2010 Sep;62(3):405-96. doi: 10.1124/pr.109.002451. Erratum in: *Pharmacol Rev.* 2014 Oct;66(4):1141. PMID: 20716669; PMCID: PMC2964903.
- Trifilieff P, Herry C, Vanhoutte P, Caboche J, Desmedt A, Riedel G, Mons N, Micheau J. Foreground contextual fear memory consolidation requires two independent phases of hippocampal

- ERK/CREB activation. *Learn Mem.* 2006 May-Jun;13(3):349-58. doi: 10.1101/lm.80206. Epub 2006 May 16. PMID: 16705140; PMCID: PMC1475817.
- Tulving, E., & Pearlstone, Z. (1966). Availability versus accessibility of information in memory for words. *Journal of Verbal Learning & Verbal Behavior*, 5(4), 381–391. [https://doi.org/10.1016/S0022-5371\(66\)80048-8](https://doi.org/10.1016/S0022-5371(66)80048-8)
- Turrigiano GG, Nelson SB. Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 2004 Feb;5(2):97-107. doi: 10.1038/nrn1327. PMID: 14735113.
- Valtorta F, Greengard P, Fesce R, Chieriegatti E, Benfenati F. Effects of the neuronal phosphoprotein synapsin I on actin polymerization. I. Evidence for a phosphorylation-dependent nucleating effect. *J Biol Chem.* 1992 Jun 5;267(16):11281-8. PMID: 1317863.
- Van Dolah DK, Mao LM, Shaffer C, Guo ML, Fibuch EE, Chu XP, Buch S, Wang JQ. Reversible palmitoylation regulates surface stability of AMPA receptors in the nucleus accumbens in response to cocaine in vivo. *Biol Psychiatry.* 2011 Jun 1;69(11):1035-42. doi: 10.1016/j.biopsych.2010.11.025. Epub 2011 Jan 8. PMID: 21216391; PMCID: PMC3089809.
- Vaynman S, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Interplay between brain-derived neurotrophic factor and signal transduction modulators in the regulation of the effects of exercise on synaptic-plasticity. *Neuroscience.* 2003;122(3):647-57. doi: 10.1016/j.neuroscience.2003.08.001. PMID: 14622908.
- Vazdarjanova A, Guzowski JF. Differences in hippocampal neuronal population responses to modifications of an environmental context: evidence for distinct, yet complementary, functions of CA3 and CA1 ensembles. *J Neurosci.* 2004 Jul 21;24(29):6489-96. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0350-04.2004. PMID: 15269259; PMCID: PMC6729865.
- Veit M, Becher A, Ahnert-Hilger G. Synaptobrevin 2 is palmitoylated in synaptic vesicles prepared from adult, but not from embryonic brain. *Mol Cell Neurosci.* 2000 Apr;15(4):408-16. doi: 10.1006/mcne.1999.0830. PMID: 10845776.
- Villarréal DM, Do V, Haddad E, Derrick BE. NMDA receptor antagonists sustain LTP and spatial memory: active processes mediate LTP decay. *Nat Neurosci.* 2002 Jan;5(1):48-52. doi: 10.1038/nrn776. PMID: 11740500.
- Vogel-Ciernia A, Wood MA. Examining object location and object recognition memory in mice. *Curr Protoc Neurosci.* 2014 Oct 8;69:8.31.1-17. doi: 10.1002/0471142301.ns0831s69. PMID: 25297693; PMCID: PMC4219523.
- Von Bernhardi R, Bernhardi LE, Eugenín J. What Is Neural Plasticity? *Adv Exp Med Biol.* 2017;1015:1-15. doi: 10.1007/978-3-319-62817-2\_1. PMID: 29080018.
- Vorhees CV, Williams MT. Assessing spatial learning and memory in rodents. *ILAR J.* 2014;55(2):310-32. doi: 10.1093/ilar/ilu013. PMID: 25225309; PMCID: PMC4240437.
- Walsh JJ, Tschakovskiy ME. Exercise and circulating BDNF: Mechanisms of release and implications for the design of exercise interventions. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2018 Nov;43(11):1095-1104. doi: 10.1139/apnm-2018-0192. Epub 2018 May 18. PMID: 29775542.
- Webb Y, Hermida-Matsumoto L, Resh MD. Inhibition of protein palmitoylation, raft localization, and T cell signaling by 2-bromopalmitate and polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem.* 2000 Jan 7;275(1):261-70. doi: 10.1074/jbc.275.1.261. PMID: 10617614.
- West AE, Griffith EC, Greenberg ME. Regulation of transcription factors by neuronal activity. *Nat Rev Neurosci.* 2002 Dec;3(12):921-31. doi: 10.1038/nrn987. PMID: 12461549.
- Wilson JP, Raghavan AS, Yang YY, Charron G, Hang HC. Proteomic analysis of fatty-acylated proteins in mammalian cells with chemical reporters reveals S-acylation of histone H3 variants. *Mol Cell Proteomics.* 2011 Mar;10(3):M110.001198. doi: 10.1074/mcp.M110.001198. Epub 2010 Nov 14. PMID: 21076176; PMCID: PMC3047146.
- Woodley KT, Collins MO. Regulation and function of the palmitoyl-acyltransferase ZDHHC5. *FEBS J.* 2021 Dec;288(23):6623-6634. doi: 10.1111/febs.15709. Epub 2021 Jan 20. PMID: 33415776.
- Woolfrey KM, Sanderson JL, Dell'Acqua ML. The palmitoyl acyltransferase DHHC2 regulates recycling endosome exocytosis and synaptic potentiation through palmitoylation of AKAP79/150. *J Neurosci.* 2015 Jan 14;35(2):442-56. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2243-14.2015. PMID: 25589740; PMCID: PMC4293401.
- Wu B, Elisovich C, Yoon YJ, Singer RH. Translation dynamics of single mRNAs in live cells and neurons. *Science.* 2016 Jun 17;352(6292):1430-5. doi: 10.1126/science.aaf1084. Epub 2016 May 5. PMID: 27313041; PMCID: PMC4939616.
- Wu D, Bacaj T, Morishita W, Goswami D, Arendt KL, Xu W, Chen L, Malenka RC, Südhof TC. Postsynaptic synaptotagmins mediate AMPA receptor exocytosis during LTP. *Nature.* 2017 Apr 20;544(7650):316-321. doi: 10.1038/nature21720. Epub 2017 Mar 29. PMID: 28355182; PMCID: PMC5734942.



- Xia Z, Storm DR. The role of calmodulin as a signal integrator for synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*. 2005 Apr;6(4):267-76. doi: 10.1038/nrn1647. PMID: 15803158.
- Xiong Q, Chen Z, Ge F. Proteomic analysis of post translational modifications in cyanobacteria. *J Proteomics*. 2016 Feb 16;134:57-64. doi: 10.1016/j.jprot.2015.07.037. Epub 2015 Aug 4. PMID: 26254007.
- Xu Y, Chou KC. Recent Progress in Predicting Posttranslational Modification Sites in Proteins. *Curr Top Med Chem*. 2016;16(6):591-603. doi: 10.2174/1568026615666150819110421. PMID: 26286211.
- Yamada K, Arai M, Suenaga T, Ichitani Y. Involvement of hippocampal NMDA receptors in encoding and consolidation, but not retrieval, processes of spontaneous object location memory in rats. *Behav Brain Res*. 2017 Jul 28;331:14-19. doi: 10.1016/j.bbr.2017.05.006. Epub 2017 May 4. PMID: 28479266.
- Yamada K, Nabeshima T. Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *J Pharmacol Sci*. 2003 Apr;91(4):267-70. doi: 10.1254/jphs.91.267. PMID: 12719654.
- Yan QS, Feng MJ, Yan SE. RNA interference-mediated inhibition of brain-derived neurotrophic factor expression increases cocaine's cytotoxicity in cultured cells. *Neurosci Lett*. 2007 Mar 6;414(2):165-9. doi: 10.1016/j.neulet.2006.12.016. Epub 2006 Dec 15. PMID: 17194538.
- Yokoi N, Fukata Y, Sekiya A, Murakami T, Kobayashi K, Fukata M. Identification of PSD-95 Depalmitoylating Enzymes. *J Neurosci*. 2016 Jun 15;36(24):6431-44. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0419-16.2016. PMID: 27307232; PMCID: PMC5015780.
- Yokoi N, Fukata Y, Sekiya A, Murakami T, Kobayashi K, Fukata M. Identification of PSD-95 Depalmitoylating Enzymes. *J Neurosci*. 2016 Jun 15;36(24):6431-44. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0419-16.2016. PMID: 27307232; PMCID: PMC5015780.
- Yu Z, Sakai M, Fukushima H, Ono C, Kikuchi Y, Koyama R, Matsui K, Furuyashiki T, Kida S, Tomita H. Contextual fear conditioning regulates synapse-related gene transcription in mouse microglia. *Brain Res Bull*. 2022 Oct 15;189:57-68. doi: 10.1016/j.brainresbull.2022.08.017. Epub 2022 Aug 18. PMID: 35987296.
- Zakharenko SS, Patterson SL, Dragatsis I, Zeitlin SO, Siegelbaum SA, Kandel ER, Morozov A. Presynaptic BDNF required for a presynaptic but not postsynaptic component of LTP at hippocampal CA1-CA3 synapses. *Neuron*. 2003 Sep 11;39(6):975-90. doi: 10.1016/s0896-6273(03)00543-9. PMID: 12971897.
- Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O'Keefe S, Phatnani HP, Guarnieri P, Caneda C, Ruderisch N, Deng S, Liddelow SA, Zhang C, Daneman R, Maniatis T, Barres BA, Wu JQ. An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci*. 2014 Sep 3;34(36):11929-47. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014. Erratum in: *J Neurosci*. 2015 Jan 14;35(2):846-6. PMID: 25186741; PMCID: PMC4152602.
- Zhang Y, Liu L, Luo B, Tang H, Yu X, Bao S. Calcyclin-binding protein contributes to cholangiocarcinoma progression by inhibiting ubiquitination of MCM2. *Oncol Res*. 2023 May 24;31(3):317-331. doi: 10.32604/or.2023.028418. PMID: 37305391; PMCID: PMC10229312.
- Zheng B, DeRan M, Li X, Liao X, Fukata M, Wu X. 2-Bromopalmitate analogues as activity-based probes to explore palmitoyl acyltransferases. *J Am Chem Soc*. 2013 May 15;135(19):7082-5. doi: 10.1021/ja311416v. Epub 2013 May 3. PMID: 23631516.
- Zhou B, Hao Q, Liang Y, Kong E. Protein palmitoylation in cancer: molecular functions and therapeutic potential. *Mol Oncol*. 2023 Jan;17(1):3-26. doi: 10.1002/1878-0261.13308. Epub 2022 Sep 10. PMID: 36018061; PMCID: PMC9812842.
- Zhou X, Lin DS, Zheng F, Sutton MA, Wang H. Intracellular calcium and calmodulin link brain-derived neurotrophic factor to p70S6 kinase phosphorylation and dendritic protein synthesis. *J Neurosci Res*. 2010 May 15;88(7):1420-32. doi: 10.1002/jnr.22321. PMID: 20029971; PMCID: PMC2857705.
- Zou C, Ellis BM, Smith RM, Chen BB, Zhao Y, Mallampalli RK. Acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase I (Lpcat1) catalyzes histone protein O-palmitoylation to regulate mRNA synthesis. *J Biol Chem*. 2011 Aug 12;286(32):28019-25. doi: 10.1074/jbc.M111.253385. Epub 2011 Jun 17. PMID: 21685381; PMCID: PMC3151047.

## 10. ANEXOS

Como producto principal de los estudios de posgrado, se realizó la siguiente publicación:

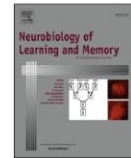
Neurobiology of Learning and Memory 200 (2023) 107733



Contents lists available at ScienceDirect

### Neurobiology of Learning and Memory

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ynlme](http://www.elsevier.com/locate/ynlme)



## Inhibition of hippocampal palmitoyl acyltransferase activity impairs spatial learning and memory consolidation

Oscar Urrego-Morales<sup>a</sup>, Elvi Gil-Lievana<sup>a</sup>, Gerardo Ramirez-Mejia<sup>a</sup>, Luis Francisco Rodríguez-Durán<sup>a</sup>, Martha Lilia Escobar<sup>b</sup>, Ilse Delint-Ramirez<sup>c</sup>, Federico Bermúdez-Rattoni<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México City, México

<sup>b</sup> División de Investigación y Estudios de Posgrado, Facultad de Psicología, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México City, Mexico

<sup>c</sup> Department of Psychiatry, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, USA

#### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Palmitoylation  
Acquisition  
Consolidation  
Spatial memory

#### ABSTRACT

Protein palmitoylation regulates trafficking, mobilization, localization, interaction, and distribution of proteins through the palmitoyl acyltransferases (PATs) enzymes. Protein palmitoylation controls rapid and dynamic changes of the synaptic architecture that modifies the efficiency and strength of synaptic connections, a fundamental mechanism to generate stable and long-lasting memory traces. Although protein palmitoylation in functional synaptic plasticity has been widely described, its role in learning and memory processes is poorly understood. In this work, we found that PATs inhibition into the hippocampus before and after the training of Morris water maze (MWM) and object location memory (OLM) impaired spatial learning. However, we demonstrated that PATs inhibition during the retrieval does not affect the expression of spatial memory in both MWM and OLM. Accordingly, long-term potentiation induction is impaired by inhibiting PATs into the hippocampus before high-frequency electrical stimulation but not after. These findings suggest that PATs activity is necessary to modify neural plasticity, a mechanism required for memory acquisition and consolidation. Like phosphorylation, active palmitoylation is required to regulate the function of already existing proteins that change synaptic strength in the hippocampus to acquire and later consolidate spatial memories.

#### 1. Introduction

Protein palmitoylation, the thioester linkage of saturated 16-carbons palmitate to cysteine residues, is a reversible process that is dynamically regulated by specific cellular stimuli. Palmitoylation serves both to tether proteins to membranes and to direct their localization to specific membrane regions (Camp and Hofmann, 1993; Conibear and Davis, 2010; Rocks et al., 2010; Salaun et al., 2010; Kong et al., 2013; Vartak et al., 2014) and emerges as a crucial conserved mechanism to orchestrate the subcellular distribution of synaptic proteins. Palmitoylation participates in many aspects of neuronal development, regulation of neurotransmission and synaptic plasticity in the nervous system through the mobilization, localization, and compartmentalization of proteins (Ji and Skup, 2021). Protein palmitoylation is catalyzed by palmitoyl acyltransferase enzymes (PATs) (Fukata and Fukata, 2010; Montersino

and Thomas, 2015; Fukata et al., 2016), and a family of 23 PATs enzymes has been identified in mammals. Most PATs are transmembrane enzymes located in the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum. In the brain, PATs ZDHHC2, ZDHHC5, ZDHHC8 and DHHC17 have been found in dendrites and spines to regulate the location, mobilization, and function of multiple signalling proteins, including ionotropic and metabotropic glutamate receptors (Hayashi et al., 2005, 2009; Noritake et al., 2009; Milnerwood et al., 2013; Zareba-Kozioł et al., 2018), PSD-95, Cdc42,  $\delta$ -catenin, among others. In the brain, palmitoylation has received attention because of its contribution to modulate synaptic plasticity through ionotropic and metabotropic glutamatergic receptor's location, mobilization, and function in response to neural activity (Hayashi et al., 2009; Thomas and Haganir, 2013; Han et al., 2015; Jeyifous et al., 2016).

It is well established that glutamatergic signalling modules long-term

*Abbreviations:* HIP, hippocampus; HFS, high frequency stimulation; LTD, long-term depression; LTP, long-term potentiation; MWM, Morris water maze; OLM, Object location memory; PATs, palmitoyl acyltransferases.

\* Corresponding author at: División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, 04510 Mexico City.

E-mail address: [fbermude@ifc.unam.mx](mailto:fbermude@ifc.unam.mx) (F. Bermúdez-Rattoni).

<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2023.107733>

Received 14 October 2022; Received in revised form 12 January 2023; Accepted 15 February 2023

Available online 18 February 2023

1074-7427/© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.



potentiation (LTP) and long-term depression (LTD). These two forms of synaptic plasticity have been extensively studied and are considered cellular correlates of learning and memory processes (Lüscher and Malenka, 2012; Takeuchi et al., 2013; Ji and Skup, 2021). Numerous studies have demonstrated that defects in protein palmitoylation are associated with several neurological disorders that lead to cognitive impairment (Fukata and Fukata, 2010; Cho and Park, 2016; Melo et al., 2020; Zareba-Kozioł et al., 2018). Moreover, the deletion of the palmitoyl acyltransferase ZDHHC8 in mice through 22q11.2 chromosome deletion displays dendritic spine deficit and impairs structural plasticity (Mukai et al., 2008).

The role of palmitoylation in functional synaptic plasticity has been well documented and extensively investigated (Thomas and Hugarin, 2013; Matt et al., 2019; Sohn and Park 2019; Hayashi, 2020; Ji and Skup, 2021). However, just a few studies show the relevance of PATs in spatial memory (Milnerwood et al., 2013; Brigidi et al., 2014). Hence, the role of PATs activity in the different stages of distinct forms of hippocampus-dependent memories still needs to be better understood. To understand the impact of protein palmitoylation on learning and memory processes, we aimed to determine the effect of pharmacological inhibition of PATs on rat hippocampal plasticity and behavioral responses.

In this work, we studied the effect of PATs inhibition in the acquisition, consolidation, and retrieval of spatial hippocampal-dependent memories. We found that the inhibition of PATs activity in the dorsal hippocampus impairs the acquisition and consolidation but not retrieval of spatial memories. However, PATs inhibition did not interfere with the consolidation of non-hippocampal-dependent memories, like the object recognition memory. Additionally, we showed that PATs inhibition interferes with the synaptic plasticity, measured through the long-term potentiation (LTP) of the Schaffer Collaterals hippocampal pathway. In summary, these results suggest that protein palmitoylation modulates synaptic strength underlying acquisition and consolidation of spatial memory in the hippocampus.

## 2. Methods

### 2.1. Animals

Two-month-old (250–350 g) male Wistar rats were used for all experiments. Rats were housed individually at 18–22 °C, 45–55 % humidity, under a 12/12 h light/dark cycle with free access to food and water. All experiments were conducted during the light period of the cycle. All experiments were approved by Instituto de Fisiología Celular (FBR125-18) of the Universidad Nacional Autónoma de México and complied in accordance with the Official Mexican Standard (NOM-062-ZOO-1999).

### 2.2. Drugs

Previous studies have shown that 2-Bromopalmitate inhibits a wide range of members of palmitoyl acyl transferases family (Webb et al., 2000; Pedro et al., 2013). Kinetic studies of 2-Bromopalmitate inhibitors have demonstrated that the DHHC PATs activity is irreversibly and strongly inhibited when tens to hundreds of micromolar concentrations are used in *in vitro* experiments (Jennings et al., 2009). Van Dolah et al. (2011) also demonstrated that the 2-Bromopalmitate (600  $\mu$ M, same conditions used during our experiments) inhibits the palmitoylation of GluR1 and GluR3 subunits of AMPA receptors in the nucleus accumbens, therefore, the motor activity of animals is altered. 2-Bromopalmitate (2-Bromohexadecanoic acid, 21604, Sigma-Aldrich) was prepared in stock solution at 3.0 mM dissolved in 25 % DMSO (D8779, Sigma-Aldrich). Stock solution aliquots were stored at –70 °C for up to 2 months. The stock solution was diluted to 600  $\mu$ M with 0.9 % saline solution (final DMSO concentration 5 %) before intra-hippocampal microinfusions. The vehicle solution contains the same concentration of DMSO.

### 2.3. Stereotaxic surgery and microinfusion.

Rats were anaesthetised with an intraperitoneal injection of ketamine (70 mg/kg of body weight) and xylazine (15 mg/kg of body weight). After induction of anesthesia, rats were placed in a stereotaxic apparatus (51603, Stoelting). An incision in the scalp was made and the head position was adjusted to a horizontal plane. Bilateral 23G stainless steel cannulas (10 mm long) were implanted into the dorsal hippocampus (from bregma AP: –3.6 mm; ML:  $\pm$ 3.0; DV: –1.3). The stereotaxic coordinates were selected according to Paxinos and Watson, 1996. Two screws were located anterior and posterior to the cannulas. Cannulas and screws were anchored with dental adhesive and dental acrylic cement. Stylets were inserted into guide cannulas to prevent clogging. Rats were allowed to recover for ten days before behavioral experiments.

Microinfusions were performed with a 30G infusion needle (4000-74-BX, Monoject™) extended 2.0 mm from the tip of the guide cannula. Microinfusion needles were connected through polyethylene tubes to 10  $\mu$ l Hamilton microsyringes driven by a microinfusion pump (Cole Parmer Instruments). Intra-hippocampal microinfusions were performed 15 min before or after training, and they consisted of 1.0  $\mu$ l per hemisphere at a rate of 0.25  $\mu$ l/min and 2 min for diffusion.

### 2.4. Morris water maze training

The water maze apparatus consisted of a black, circular fiberglass pool (170 cm diameter) filled with water. A black escape platform (15cmx15cmx40cm) was located on the center of the pool's target (T) quadrant, 2 cm below the water surface and 30 cm from the pool walls edge. Internal cues (white circle and square, 12 cm side) were located on the walls of the left (L) and right (R) quadrants. Low energy bulb was located 1.5 m above the pool. A video camera was mounted above the apparatus to record trials with Debut Video Capture-NCH computer software version 5.73. The rats were handled for three consecutive days for 3 min before training to reduce stress levels. Training phase was performed by 1 day. During the training session, rats performed 10 trials of training. The rats were placed into the pool near and facing the pool wall from one of the ten starting positions previously established for each trial. Animals were allowed to swim and reach the escape platform for a limited time of 60 s. Time was recorded as latency to the hidden platform in seconds. If the rats failed to find the platform, they were guided there by the experimenter. Once on the platform, rats remained there for 30 s before being placed in an open box for an inter-trial interval of 30 s. After the inter-trial interval, rats were returned to the pool for the next trial. After the end of the last trial, rats were returned to their home cage. The long-term memory (LTM) test was performed twenty-four hours after the training session. During the LTM test, the platform was removed, and rats were placed into the pool near and facing the opposite (O) quadrant wall for a single 60 s trial. After the 60 s, rats were returned to their home cages. Video records from the LTM test were analyzed offline for latency to the platform area in seconds and the number of crossings to the platform area.

### 2.5. Object location memory training

The apparatus consisted of a square wooden arena (40  $\times$  40  $\times$  40 cm) coated with grey paint, covered with a thin sawdust layer and a rectangular black and white striped cue. The objects to be discriminated were a light bulb (3  $\times$  3  $\times$  10 cm) and a jar (3  $\times$  3  $\times$  6 cm). A video camera was mounted above the apparatus to record trials with Debut Video Capture-NCH computer software version 5.73. During three consecutive days, rats were positioned into the arena without any object for 5 min. During the training phase, rats were placed into the arena with one light bulb and one jar located near the cue, and rats were allowed to explore the objects for 5 min. Different groups of rats were evaluated for short-term (STM) or long-term memory (LTM) tests. Ninety minutes



after training, the STM test was assessed; rats were placed into the arena with one light bulb and one jar for 5 min, one object was moved farther from the cue. The position of the novel object was counterbalanced. Twenty-four hours after training, the LTM test was performed similarly to STM. The exploration time for each object was quantified offline. The recognition index was calculated by dividing a familiar or novel location's exploration time by the total exploration time. Rats with a recognition index near 0.5 during the training phase were included in the analysis.

### 2.6. Object recognition memory training

The apparatus and objects to be discriminated against were like those for OLM. During three consecutive days, rats were positioned into the arena without any object for 5 min. During the training phase, rats were placed into the arena with two copies of the same object (A) located near the cue; rats were allowed to explore the objects for 5 min. Twenty-four hours after training, a long-term memory (LTM) test was assessed; rats were placed into the arena with one familiar object (A) and one novel object (B) for 5 min. Novel objects were counterbalanced. Exploration time for each object was quantified offline. The recognition index was calculated by dividing the exploration time of object A or B by the total exploration time. Rats with a recognition index near 0.5 during the training phase were included for the analysis.

### 2.7. Electrophysiological recordings

Rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (20 mg/kg body weight) and intramuscular injection of xylazine (15 mg/kg body weight); maintenance dose of pentobarbital sodium (10 mg/kg body weight) was administered 60 min later. Once anesthetized, rats were placed in a stereotaxic apparatus (51603, Stoelting). An incision in the scalp was made and the head position was adjusted to the horizontal plane. Responses were unilaterally evoked by a bipolar concentric stainless steel stimulation electrode located in the CA3 region of the hippocampus (from bregma, AP: -2.2 mm; ML: -2.0 mm; DV: -1.5 mm). Unilateral responses were registered with a stainless-steel monopolar electrode located in the CA1 region of the hippocampus (from bregma, AP: -2.0 mm; ML: -1.4 mm; DV: -1.5 mm). Constant 0.2 mV current stimulation was provided by a Grass S48 stimulator and delivered to the stimulating electrode through a Grass Stimulus Isolation Unit (PSUI6). Evoked responses were sent to an amplifier Grass P5. The electric signal was digitalized, stored, and analyzed using the software Datawave SciWorks (Broomfield, CO, USA).

Input/output curves. I/O curves were generated by systematic variation of the stimulus current (1x-10x) to determine the basal synaptic efficiency. The relation between the entrance current and the output voltage was measured in the CA3-CA1. The basal intensity was determined as the minimum stimulation required to evoke a 0.2 mV response.

**Long-term potentiation induction.** After an electrically evoked response baseline was established for 15 min with a stimulus intensity corresponding to 50 % of the EPSP maximum amplitude. The LTP was induced by delivering four trains of stimulation (1 s, 100 Hz) with 20 s of inter-train time. The post-stimulation evoked responses were registered for 1 h. Long-term potentiation was calculated by the percentage of the change of evoked response amplitude compared to the baseline. To analyse the effect of PAT inhibition over long-term potentiation, four groups were evaluated: vehicle and 2-bromopalmitate groups injected 15 min before LTP induction, and vehicle and 2-bromopalmitate groups injected 15 min after LTP induction.

### 2.8. Nissl stain

After the LTM test, mice were sacrificed with an overdose of intraperitoneal pentobarbital monosodium (200 mg/kg). Intracardial perfusion was performed with 100 mL of 0.9 % saline solution and pre-fixed

with 100 mL of 4 % paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer solution. Brains were removed and fixed in 4 % paraformaldehyde and stored for one week. Brains were treated with 30 % sucrose at least two days before slicing. Brains were sliced using a cryostat (Leica, CMI520) in a 40  $\mu$ m section and mounted on gelatin-coated microscope slides. Slices were stained with modified Nissl protocol, briefly: hydration with decreasing ethanol concentration, from 90 % ethanol to distilled water. Slices were immersed in cresyl violet acetate (0.5 % cresyl violet acetate, 0.3 % glacial acetic acid in distilled water) per 2 min; stain excess was washed with distilled water following immersions of 50 % ethanol per 1 min. After that, slices were washed with ethanol acid (1 % glacial acetic acid in 70 % ethanol) for 2 min. Finally, slices were dehydrated and mounted with a resin mounting medium.

### 2.9. Statistical analysis

Data were analysed using GraphPad Prism software version 8.0. The Kolmogorov-Smirnov test was performed for normal distribution. The data were plotted as mean  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA was used with Bonferroni's post hoc test for MWM training, and a one-tailed unpaired *t*-test was performed for Morris water maze LTM and OLM. Electrophysiological recordings were analysed by repeated two-way ANOVA of the baseline (15 min) and after high-frequency stimulation (last 15 min). Post-hoc test analysis was performed with Bonferroni's test and the *P* < 0.05 threshold was considered statistically significant.

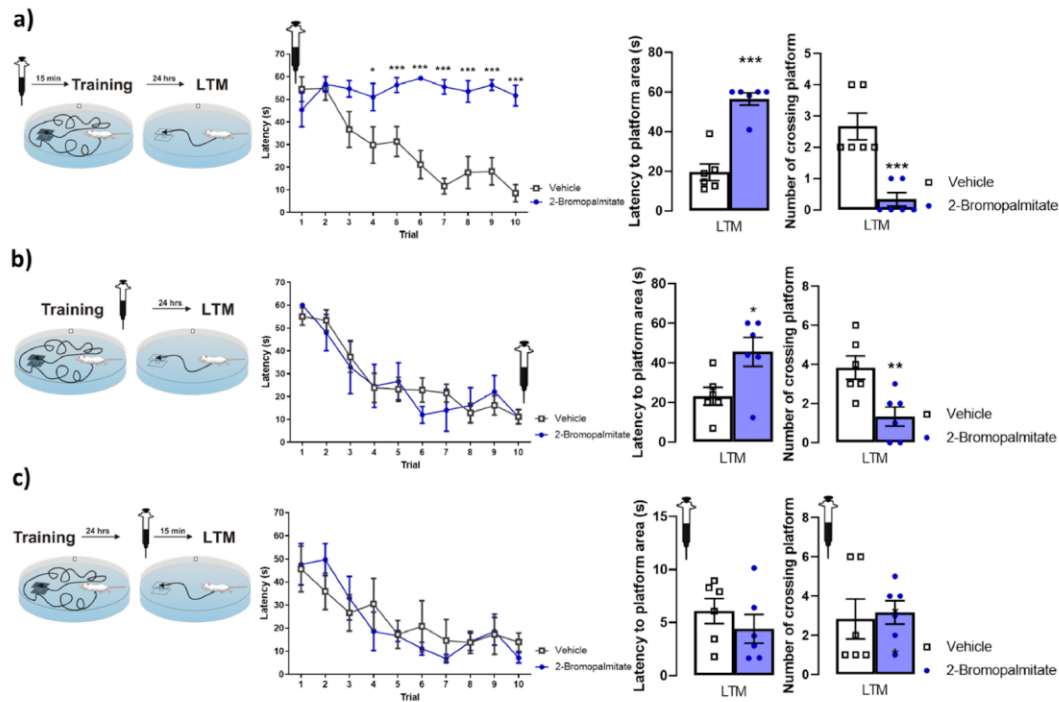
## 3. Results

### 3.1. Learning and consolidation of MWM memory are PATs activity-dependent

We determined the role of palmitoylation in spatial learning and memory during the acquisition, consolidation, and retrieval phases of the Morris water maze (MWM), a behavioural task for rodents that relies on distal cues to navigate around the swimming area to locate a platform. Rats were administered with intra-hippocampal injections of an irreversible inhibitor that binds covalently to the active site of the PATs (2-bromopalmitate) (Davda et al., 2013). The training phase consisted of ten trials and the long-term memory test was evaluated twenty-four hours later for 1 min. Fig. 1a shows that rats administered with PATs inhibitor 2-bromopalmitate before the training phase spent more time searching for the hidden platform than the vehicle group during the training trials. Consequently, during the long-term memory (LTM) test, the 2-bromopalmitate group had a higher latency and fewer crossings to the hidden platform area. To differentiate whether the effect of 2-bromopalmitate is on acquisition or consolidation of the task we administered 2-bromopalmitate or vehicle immediately after the last training. We observed that although both groups of rats learned the spatial position of the hidden platform, the 2-bromopalmitate group had a higher latency and a lesser number of crossings to the hidden platform area during the LTM test (Fig. 1b). To study whether active palmitoylation of proteins plays a role in retrieving the spatial memory, we administered 2-bromopalmitate before the LTM test in trained rats. Inhibition of PATs did not affect the latency and number of crossings to the hidden platform area (Fig. 1c). Together, these findings indicate that PATs activity is necessary for learning and consolidating spatial memory in the MWM task, but not during the retrieval of the MWM task.

### 3.2. Acquisition and consolidation of object location memory are PATs activity-dependent

We extended our results by evaluating the effects of palmitoylation inhibition on object location memory (OLM), a spatial memory task related to the ability of the rodent to discriminate the novel location of an object. An advantage of the OLM is the short-term memory test to compare the acquisition process. To this end, we tested the effect of



**Fig. 1.** Inhibition of PATs impairs acquisition and consolidation of MWM Task. a) Microinjection of PATs inhibitor (2-bromopalmitate) or vehicle in the hippocampus was performed 15 min before training and tested 24 h after long-term memory (LTM). The vehicle group decreased the arrival latency at the platform as the trials progressed. The 2-bromopalmitate group remained constant along trials (two-way ANOVA: treatment  $F_{1,10} = 35.85$ ,  $P = 0.0001$ ; trial  $F_{9,90} = 5.654$ ,  $P < 0.0001$ ; interaction  $F_{9,90} = 7.557$ ,  $P < 0.0001$ , Post-hoc Bonferroni test: trial 5  $t_{(100)} = 3.316$ ,  $P = 0.0127$ , trial 6  $t_{(100)} = 5.063$ ,  $P < 0.0001$ ; trial 7  $t_{(100)} = 5.815$ ,  $P < 0.0001$ ; trial 8  $t_{(100)} = 4.753$ ,  $P < 0.0001$ ; trial 9  $t_{(100)} = 5.063$ ,  $P < 0.0001$ ; trial 10  $t_{(100)} = 5.726$ ,  $P < 0.0001$ ). Latency to reach the platform area was higher (unpaired  $t$ -test,  $t_{(10)} = 7.090$ ,  $P < 0.0001$ ). The number of crossings to the platform was lesser in a 2-bromopalmitate group than in the vehicle group (unpaired  $t$ -test,  $t_{(10)} = 4.950$ ,  $P = 0.0006$ ). b) Rats were trained (two-way ANOVA: treatment  $F_{1,10} = 0.03823$ ,  $P = 0.8489$ ; trial  $F_{3,502,35,02} = 15.49$ ,  $P < 0.0001$ ; interaction  $F_{9,90} = 0.5221$ ,  $P = 0.8550$ ), and immediately after were microinjected with 2-bromopalmitate or vehicle into the hippocampus. The latency to the platform area tends to be higher (unpaired  $t$ -test,  $t_{(10)} = 2.626$ ,  $P = 0.0254$ ), and the number of crossings to the platform was lesser in the 2-bromopalmitate group than the vehicle group (unpaired  $t$ -test,  $t_{(10)} = 3.213$ ,  $P = 0.0093$ ). c) Rats were trained (two-way ANOVA: treatment  $F_{1,10} = 0.08419$ ,  $P = 0.7776$ ; trial  $F_{4,070,40,70} = 7.016$ ,  $P = 0.0002$ ; interaction  $F_{9,90} = 0.6527$ ,  $P = 0.7490$ ) and 15 min before the LTM test, rats were microinjected with 2-bromopalmitate or vehicle in the hippocampus. Latency to platform area (unpaired  $t$ -test,  $t_{(10)} = 0.9311$ ,  $P = 0.3737$ ) and the number of crossings to the platform was similar in both groups (unpaired  $t$ -test,  $t_{(10)} = 0.2828$ ,  $P = 0.7831$ ). Syringe indicates the time of administration of 2-bromopalmitate or vehicle in the hippocampus. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.0001$ .

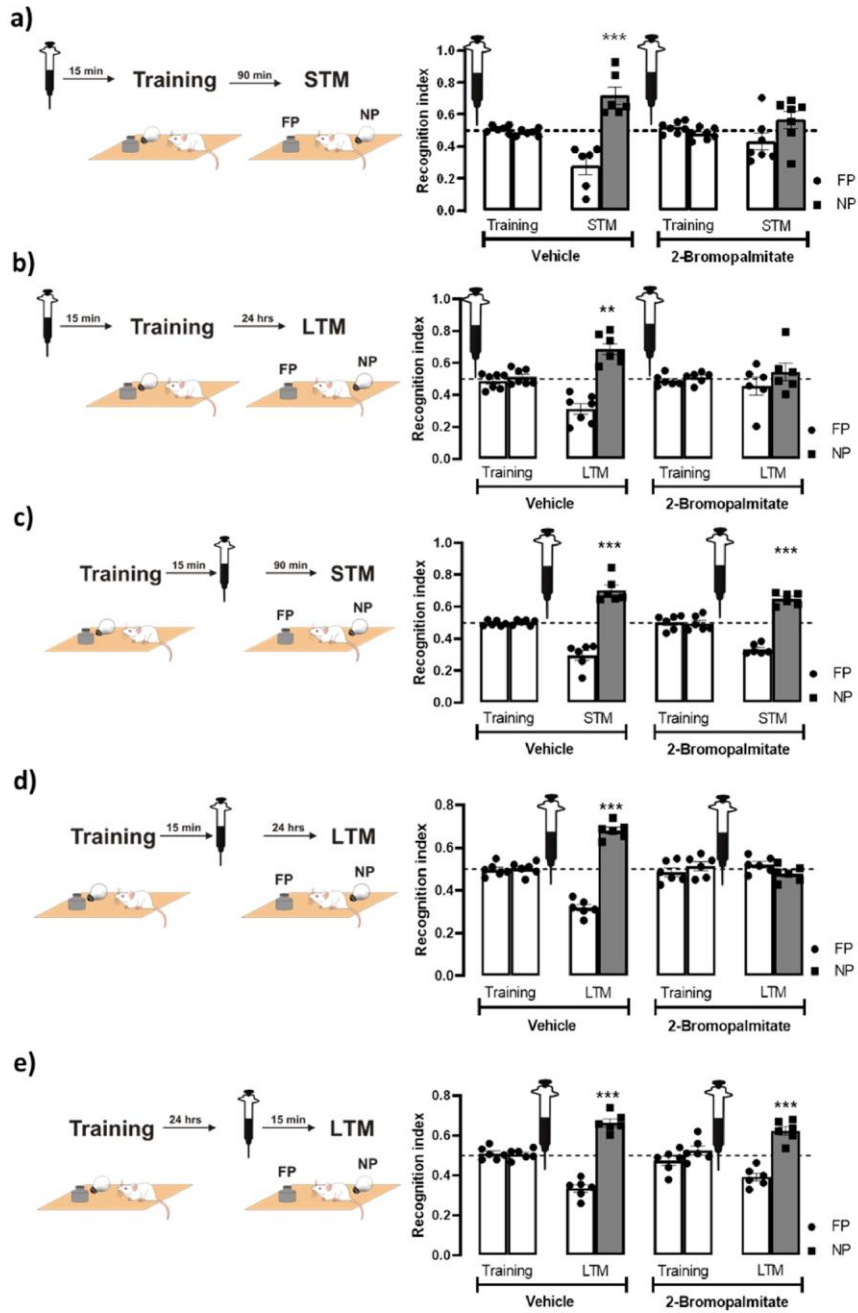
intrahippocampal administration of 2-bromopalmitate on the training and consolidation of object location memory in rats. The training phase, rats were allowed to freely explore two identical objects in specific positions for 5 min. During the memory test, the location of one of the objects was changed to a novel location. To unveil the effect of PATs inhibition in the training phase, we administered 2-bromopalmitate before training. We observed a similar recognition index for both locations in the vehicle and 2-bromopalmitate groups, without preference for any location. During the short-term memory test, the vehicle group explored the object in a novel location vs. the object in a familiar location. However, the 2-bromopalmitate group did not discriminate between the object in a novel location compared to the object in a familiar location (Fig. 2a), which means the acquisition was impaired. Similar results were obtained for long-term memory test (Fig. 2b).

Then we studied the role of active protein palmitoylation on memory consolidation through administration of 2-bromopalmitate immediately after the training phase. Moreover, 2-bromopalmitate and control groups displayed a good recognition memory during the short-term test, spending more time exploring the object in the new location than the familiar location (Fig. 2c). These results indicate no lingering unspecific effects on short-term memory by the drug. Nevertheless, during the

long-term memory test, the 2-bromopalmitate group had an impaired memory showing a similar recognition index for both objects compared with the vehicle group that strongly preferred to explore the object in a novel location. In addition, the results showed that the 2-bromopalmitate did not alter motor activity since the total exploration times remained equal for both groups (see Table 1). Finally, the PATs inhibition does not impair long-term memory when administered before the test (Fig. 2e). Therefore, we inferred that spatial information acquisition and consolidation depend on PATs activity. However, protein palmitoylation is not relevant once spatial memory trace is established. Therefore, we inferred that, like MWM, the spatial learning and memory processes for OLM tasks require PATs activity.

### 3.3. Pats inhibition in the hippocampus does not impair hippocampal-independent memories

To know whether PATs inhibition has permanent non-specific effects, we used object recognition memory (ORM), a hippocampus-independent memory task (Balderas et al., 2008). Hence, we evaluated the ability of rats to recognize a previously encountered object as familiar by measuring the exploration time of two different objects. The



(caption on next page)



**Fig. 2. Inhibition of PATs impairs acquisition and consolidation of object location memory.** a) Microinjection of PATs inhibitor (2-bromopalmitate) or vehicle in the hippocampus was performed 15 min before training (vehicle, unpaired *t*-test,  $t_{(10)} = 1.789$ ,  $P = 0.1039$ ; 2-Bromopalmitate, unpaired *t*-test,  $t_{(12)} = 2.111$ ,  $P = 0.0564$ ) and tested 90 min later for STM. Although the vehicle group has a high recognition index of the object in a new position (NP) (unpaired *t*-test,  $t_{(10)} = 5.693$ ,  $P = 0.0002$ ), the 2-bromopalmitate group shows a similar recognition index for objects in a new position and familiar position (FP) (unpaired *t*-test,  $t_{(12)} = 1.814$ ,  $P = 0.0948$ ). b) Microinjection of PATs inhibitor (2-bromopalmitate) or vehicle in the hippocampus was performed 15 min before training (vehicle, unpaired *t*-test,  $t_{(12)} = 1.041$ ,  $P = 0.3183$ ; 2-bromopalmitate, unpaired *t*-test,  $t_{(10)} = 0.9602$ ,  $P = 0.3596$ ) and tested 24 h after for LTM. In contrast, the vehicle group recognizes the new position (unpaired *t*-test,  $t_{(12)} = 7.972$ ,  $P < 0.0001$ ), the recognition index of the 2-bromopalmitate group was similar for objects in novel and familiar positions (unpaired *t*-test,  $t_{(10)} = 1.137$ ,  $P = 0.2820$ ). c) Rats were allowed to explore objects for 5 min (vehicle, unpaired *t*-test,  $t_{(10)} = 0.6226$ ,  $P = 0.5475$ ; 2-bromopalmitate, unpaired *t*-test,  $t_{(10)} = 0.2446$ ,  $P = 0.8117$ ) and immediately after were microinjected with 2-bromopalmitate or vehicle into the hippocampus. Ninety minutes later, both groups showed STM (vehicle, unpaired *t*-test,  $t_{(10)} = 9.160$ ,  $P < 0.0001$ ; 2-bromopalmitate, unpaired *t*-test,  $t_{(10)} = 15.46$ ,  $P < 0.0001$ ). d) Rats were allowed to explore objects for 5 min (vehicle, unpaired *t*-test,  $t_{(10)} = 0.2872$ ,  $P = 0.7798$ ; 2-bromopalmitate, unpaired *t*-test,  $t_{(10)} = 0.9938$ ,  $P = 0.3438$ ) and immediately after, vehicle or 2-bromopalmitate was injected. Twenty-four hours later, a long-term memory test (LTM) was performed. The vehicle group showed LTM (unpaired *t*-test,  $t_{(10)} = 16.43$ ,  $P < 0.0001$ ), while the 2-bromopalmitate group did not recognize the object in a novel position (unpaired *t*-test,  $t_{(10)} = 1.941$ ,  $P = 0.0810$ ). e) Rats were allowed to explore objects for 5 min (vehicle, unpaired *t*-test,  $t_{(10)} = 0.2284$ ,  $P = 0.8239$ ; 2-bromopalmitate, unpaired *t*-test,  $t_{(10)} = 1.573$ ,  $P = 0.1468$ ) and 15 min before long-term memory test (LTM), animals were microinjected with 2-bromopalmitate or vehicle into the hippocampus. Index recognition was higher for the novel position than the familiar position in both groups (vehicle, unpaired *t*-test,  $t_{(10)} = 12.31$ ,  $P < 0.0001$ ; 2-bromopalmitate, unpaired *t*-test,  $t_{(10)} = 8.070$ ,  $P < 0.0001$ ). Syringe indicates the time of administration of 2-bromopalmitate or vehicle in the hippocampus. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.0001$ .

**Table 1**

**Total exploration times in memory tasks.** Total exploration times for vehicle and 2-bromopalmitate before training, after training and before long-term memory (LTM) in Morris Water Maze (Fig. 1), Object Location Memory (Fig. 2) and Object Recognition Memory (Fig. 3). All data are shown as mean  $\pm$  SEM.

Morris Water Maze		
	Training (cm/s)	LTM (cm/s)
<b>Before training</b>		
Vehicle	22.03 $\pm$ 1.68	23.46 $\pm$ 5.64
2-Bromopalmitate	22.94 $\pm$ 0.55	25.42 $\pm$ 4.27
<b>After training</b>		
Vehicle	24.19 $\pm$ 1.71	24.36 $\pm$ 2.74
2-Bromopalmitate	25.07 $\pm$ 1.85	25.78 $\pm$ 0.81
<b>Before LTM</b>		
Vehicle	24.53 $\pm$ 2.77	26.13 $\pm$ 0.75
2-Bromopalmitate	22.22 $\pm$ 3.51	21.33 $\pm$ 5.67
<b>Object Location Memory</b>		
	Training (s)	LTM (s)
<b>Before training</b>		
Vehicle	16.78 $\pm$ 3.63	14.37 $\pm$ 5.75
2-Bromopalmitate	17.18 $\pm$ 8.51	13.55 $\pm$ 2.44
<b>After training</b>		
Vehicle	23.60 $\pm$ 5.89	18.28 $\pm$ 8.56
2-Bromopalmitate	26.62 $\pm$ 5.78	15.31 $\pm$ 5.24
<b>Before LTM</b>		
Vehicle	22.38 $\pm$ 2.07	12.57 $\pm$ 3.53
2-Bromopalmitate	23.55 $\pm$ 7.28	13.97 $\pm$ 3.72
<b>Object Recognition Memory</b>		
	Training (s)	LTM (s)
<b>After training</b>		
Vehicle	15.70 $\pm$ 7.69	15.14 $\pm$ 7.17
2-Bromopalmitate	17.17 $\pm$ 8.51	13.55 $\pm$ 2.44

drug administration was performed immediately after the ORM training phase in the hippocampus. The results showed that both groups, 2-bromopalmitate or vehicle, had a reliable recognition index for the novel object during the LTM test (Fig. 3a). Thus, administration of 2-bromopalmitate in the hippocampus (Fig. 3b) does not impair the establishment of hippocampal-independent recognition memory, such as ORM.

### 3.4. Induction but not maintenance of long-term potentiation requires PATs activity

All in all, our results show that PATs inhibition impairs acquisition and consolidation of spatial memory, but retrieval is unaffected. This result suggests that acquisition and consolidation involve synaptic and broad cellular palmitoylation, necessary to alter neuronal circuitry, gene expression and electrical activity. Mainly, the location and interaction of ionotropic glutamatergic receptors with other proteins is regulated by palmitoylation (Yamazaki et al., 2001, Lu and Roche, 2012, Hayashi,

2021), for which we propose that these modifications modulate the neuronal communication to strengthen the engrams that encode and store spatial memories in the hippocampus. Therefore, we hypothesize that PATs inhibition will impair the LTP in the Schaffer collaterals pathway, a critical circuit involved in spatial memories.

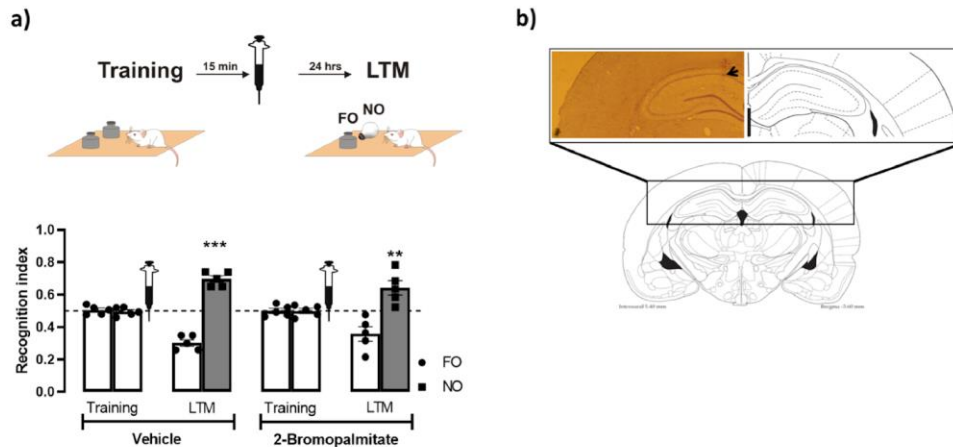
To determine whether PATs inhibition will affect synaptic plasticity, we performed a high-frequency electrical stimulation (HFS) of the collateral Schaffer projections and registered the electrical activity in the CA1 region of the hippocampus (Fig. 4a). An input-output analysis shows that the inhibition of PATs activity 15 min before the recording alters the basal communication in the hippocampal neurons of the Schaffer collaterals pathway (Fig. 4b). We observed a strong induction of long-term potentiation when rats were administered with the vehicle before HFS. However, administration of 2-bromopalmitate before HFS impaired induction of long-term potentiation, and the PATs inhibition induces a long-term depression-like (Fig. 4c). In addition, administration of 2-bromopalmitate after induction of long-term potentiation does not alter the registered evoked response up to 1 h of recording, like the vehicle (Fig. 4d). Our results suggest a prominent role for PAT activity in neuronal communication, and their inhibition causes alterations in the facilitation of the CA3-CA1 LTP pathway. However, once these alterations occur, PAT activity is no longer required.

## 4. Discussion

Protein palmitoylation is the most common post-translational lipid modification in the brain (Fukata and Fukata, 2010; Salaun et al., 2010). It controls many aspects of neuronal function, such as development, control of neurotransmission, spine development and synaptic plasticity by modifying the location of proteins in the different membranes of the neuron or altering the proteins hydrophobicity to change lipid-protein or protein-protein interactions (El-Husseini et al., 2002; Greaves and Chamberlain, 2007; Rocks et al., 2010; Vartak et al., 2014; Globa and Bamji, 2017). Many of these critical processes are required to learn and store information in the brain. Hence, the palmitoyl acyltransferases (PATs) enzymes, which mediates palmitoylation, emerge as an exciting explanation for the putative mechanisms involved in various diseases and disorders associated with learning and memory impairments (Draper and Smith, 2009; Fukata and Fukata, 2010; Cho and Park 2016; Melo et al., 2020). However, the role of PATs activity during the different stages of hippocampus-dependent memories remains unclear. In this sense, we used an inhibitor of PATs activity to unveil the functional role of protein palmitoylation in these processes.

Kang et al. (2008) showed a significant number of palmitoylated proteins, including neurotransmitter receptors subunits (NR2A, NR2B, serotonin receptor subunit 5HT-3C), transporters, adhesion proteins (protocadherins Pcdh1, 8, 9, 10 and 17, d-catenin, synCAM4), scaffolding proteins (PSD95, AKAP79/150, gephyrin) and proteins involved





**Fig. 3.** Inhibition of PATs does not affect hippocampus-independent memory. a) Microinjection of PATs inhibitor (2-bromopalmitate) or vehicle in the hippocampus was performed immediately after training (vehicle, unpaired *t*-test,  $t_{(8)} = 0.6066$ ,  $P = 0.5610$ ; 2-bromopalmitate, unpaired *t*-test,  $t_{(8)} = 0.9794$ ) and 24 h after animals were tested for LTM. The recognition index for the vehicle (unpaired *t*-test,  $t_{(8)} = 14.00$ ,  $P < 0.0001$ ) and 2-bromopalmitate group (unpaired *t*-test,  $t_{(8)} = 4.537$ ,  $P = 0.0019$ ) was higher for the novel object than the familiar object. Syringe indicates microinjection of 2-bromopalmitate or vehicle in the hippocampus. b) Representative image of the microinjection of PATs inhibitor (2-bromopalmitate) or vehicle in the CA1 region of the hippocampus in the behavioural experiments.

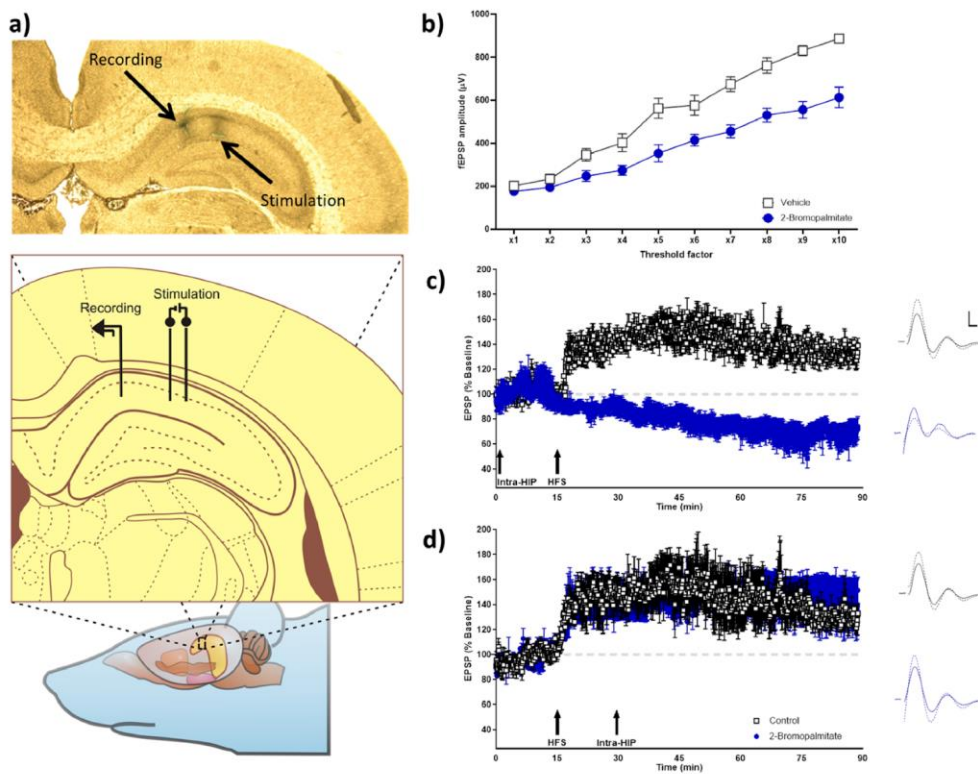
in vesicular trafficking (syntaxins, VAMP proteins) in the synaptosomal fraction extracted from whole adult rat brain tissues. Most of these synaptosomal palmitoylated proteins have been broadly associated with molecular mechanisms involved in spatial memory. Interestingly, protein palmitoylation levels of sampled proteins were modulated in neural activity models, and the pre-treatment with 2-Bromopalmitate induced a general reduction of the palmitoylation turnover of proteins. For example, protein palmitoylation of the Cdc42-palm splice variant (enriched in the hippocampus) and PSD-95, which participate in learning and memory, was reduced after treatment with 2-Bromopalmitate, impairing the enlargement and reducing the number of dendritic spines. Notably, it has been reported a significant sex-dependent pattern of PATs inhibition and their protein targets involved in synaptic plasticity (Zareba-Kozioł et al., 2021), lipid metabolism, and estradiol pathway on learning and memory, nociception, motor control, among others (Tonin et al., 2018; Meitzen et al., 2019). To reduce the sex-dependent effects of PATs inhibition, we used male rats during all the experiments. We report that PATs inhibition during the training of Morris water maze (MWM) and object location memory (OLM) impaired acquisition of spatial memory. Indeed, previous reports indicate that learning may provoke a temporal increment of protein palmitoylation to establish spatial memory (Brigidi et al., 2014; Li et al., 2010). Our findings suggest that the inhibition of PATs activity before acquisition disrupts both STM and LTM. In this sense, it has been reported that STM requires a transient and non-stabilized post-translational modification of proteins, such as PSD95 and NMDAR subunits (Fukata et al., 2004; Hayashi et al., 2009) to induce plastic changes in neural networks (Morgado-Bernal, 2011). We hypothesize that the blockade of PATs activity impairs the normal dynamic of proteins, including NMDAR subunits, which has been reported to increase up to 70 min after training a spatial task (Cercato et al., 2017). Additionally, vesicular protein trafficking and lateral mobilization of glutamatergic receptors to cell membrane lipid rafts occur during the spatial learning (Delint-Ramírez et al., 2008), a process triggered by protein palmitoylation (Linder and Deschenes, 2007; Levental et al., 2010; Delint-Ramírez et al., 2011; Nadolski and Linder, 2007; Kim et al., 2013; Deák, 2014; Han et al., 2015; Ernst et al., 2018). Consistently with the learning impairment in both spatial models, rats lacked long-term object location memory, evidenced in a longer latency to find the platform and a lower number of crosses through the platform

area in MWM, and a lesser OLM recognition index. These results suggest that PATs activity within CA1 is highly involved in spatial learning.

The molecular processes that begin during training are extended to downstream events underlying consolidation (Abel and Lattal, 2001; Florian and Roulet, 2004). Our findings demonstrated that once rats learned spatial information in the MWM and OLM paradigms, the inhibition of PATs activity impaired memory consolidation. We speculate that this consolidation impairment is a consequence of a disruption of *de novo* protein synthesis or trafficking of pre-existent proteins. Memory consolidation involves shifting a labile STM into a long-lasting stable trace by synthesizing new proteins to induce temporal changes in synaptic strength and provoke steady modifications of synaptic morphology and properties, an essential process for memory consolidation (Yamada et al., 2017). Disrupting the consolidation process by interventions such as protein synthesis inhibitors impairs the stabilization or potentiation of new synaptic connections, resulting in impaired maintenance of spatial memory. In this sense, it has been reported that during memory consolidation, the unstable new memories are stabilized over hours into long-term memories through stable synaptic modifications in neural circuits (Susman et al., 2019). This stabilization involves, among others, a shift of unstable permeable state to stable impermeable-calcium state in the AMPA receptors in the post-synapsis, a mechanism regulated by palmitoylation/depalmitoylation turnover (Dekker et al., 2010; Fukata and Fukata, 2010; Lin and Comibear, 2015). However, the inhibition of PATs activity once the memory was consolidated showed that its activity is longer not necessary for MWM nor OLM retrieval.

Further, our electrophysiological analysis shows diminished basal communication due to the inhibition of PATs activity in the hippocampal Schaffer collateral pathway. The basal transmission depends on presynaptic and postsynaptic cellular mechanisms to control neuron-to-neuron communication. In the presynaptic neuron, palmitoylation of proteins, such as synaptobrevin 2, SNAP25, synaptotagmin and syntaxin 1, might regulate the synaptic vesicle fusion and neurotransmitter release (Fasshauer et al., 1997; Veit et al., 2000; Prescott et al., 2009). Nasser et al. (2022) also reported palmitoylation of synaptic proteins, including PSD-95, CaMKV, CaMKIIa, STX1A, SPT8 and TARP-gamma-8 proteins, from hippocampal neurons increases because of a chemical LTP. In fact, according to their results, the dynamic of protein palmitoylation occurs very rapidly. In this sense, protein palmitoylation of





**Fig. 4.** Inhibition of PATs impairs induction but not maintenance of LTP. a) Stimulation electrodes were implanted in the Schaffer Collaterals (S.C.) projections while the recording electrodes were implanted in the CA1 region. b) Input-output curves for rats treated with 2-bromopalmitate and vehicle. Two-way ANOVA analysis of the I/O relationship shows significant differences between the 2-bromopalmitate and vehicle (two-way ANOVA: treatment  $F_{1,25} = 27.12$ ,  $P < 0.0001$ ; time  $F_{2,075,43,81} = 151.5$ ,  $P < 0.0001$ ; interaction  $F_{9,190} = 8.401$ ,  $P < 0.0001$ ). Hippocampal long-term potentiation (LTP) was performed in rats under anesthesia. c) Once stabilized, intra-hippocampal injection (intra-HIP) of vehicle or 2-bromopalmitate was performed, and 15 min later, high-frequency stimulation (HFS) was given (4 stimulus trains, 1 s, 100 Hz, 20 s inter-train). While the vehicle group shows a potentiated synaptic communication, the 2-bromopalmitate group shows a depressed synaptic communication for up to 90 min (two-way ANOVA basal mean vs HFS mean: treatment  $F_{1,9} = 25.22$ ,  $P < 0.0001$ ; time  $F_{1,9} = 0.04135$ ,  $P = 0.8434$ ; interaction  $F_{1,9} = 25.22$ ,  $P = 0.0007$ . Post-hoc Bonferroni test: control basal vs control HFS  $t_{(9)} = 3.262$ ,  $P = 0.0196$ ; 2-bromopalmitate basal vs 2-bromopalmitate HFS  $t_{(9)} = 3.875$ ,  $P = 0.0075$ ). d) 15 min after HFS (4 stimulus trains, 1 s, 100 Hz, 20 s inter-train), an intrahippocampal injection (intra-HIP) of vehicle or 2-bromopalmitate was performed. Synaptic potentiation was not impaired up to 90 min (two-way ANOVA: treatment  $F_{1,3} = 0.7024$ ,  $P = 0.4635$ ; time  $F_{1,3} = 25.06$ ,  $P = 0.0153$ ; interaction  $F_{1,3} = 0.5384$ ,  $P = 0.5162$ ). Solid lines represent the fEPSP before HFS and dotted lines represent the fEPSP after HFS.

PRG-1, a key protein for activity-induced insertion of AMPA receptors into the postsynaptic membrane, occurred as fast as five minutes after the induction of the chemical LTP, which is in accordance with our results, suggesting that the activity-dependent palmitoylation occurs rapidly to induce synaptic plasticity and to modify the architecture of the hippocampal circuits. Additionally, increasing postsynaptic receptors for excitatory neurotransmitters aimed at the synaptic cleft, mainly NMDA and AMPA receptors, is necessary for neuronal communication (Reiner and Levitz 2018). It has been reported that the hyperpalmitoylation of AMPA receptor subunit GluA1 hinders its activity-dependent trafficking to the plasma membrane and causes detrimental effects on LTP at CA3-CA1 hippocampal circuitry. Under these conditions, the administration of 2-Bromopalmitate reduces the palmitoylation of the AMPA receptor GluA1 subunit to normal levels and re-establish the LTP at the CA3-CA1 hippocampal synapses by high-frequency stimulation (Spinelli et al., 2017). Also, lateral mobilization and upregulation of these receptors are mediated by protein palmitoylation (El-Husseini et al., 2002; Thomas and Huganir, 2013; Jeyifous et al., 2016). In this sense, the decreased basal transmission due to PATs

inhibition might explain the impairment of presynaptic and postsynaptic mechanisms mentioned above. Importantly, although activity-dependent PATs have been reported in the hippocampus (Brigidi et al., 2014; Shimell et al., 2021), our findings suggest that PATs also regulate cellular mechanisms in an activity-independent manner.

Although there are many unanswered questions about the role of the LTP as a cellular mechanism leading to memory storage, the study of LTP has provided a way to identify and characterize the molecular mechanisms that potentially underlie memory storage (Rosenberg et al., 2014). We found that PATs inhibition impairs the induction of LTP, suggesting that molecular mechanisms involved in LTP induction, including exocytosis and mobilization of AMPA and NMDA receptors, could be PATs activity-dependent (Spinelli et al., 2017; Yokoi et al., 2016). It is widely recognized that activating the postsynaptic NMDAR in hippocampal LTP induces trafficking and modifications of AMPA receptors and other proteins in a sequential but fast manner on the postsynaptic membrane to modulate the strength of synaptic transmission (Hayashi, 2021). It is known that the activity of NMDA receptors is dynamically regulated through protein palmitoylation (Traynelis et al.,

2010; Lussier et al., 2015), to induce the activation of signalling pathways directly modulated by intracellular Ca<sup>+</sup>. Thus, Ca<sup>+</sup> triggered post-translational modifications, including protein palmitoylation, can enhance NMDA receptor function in the context of synaptic plasticity.

In this sense, information entrance induces synaptic plasticity through vesicular traffic, changing the location of proteins, and allowing specific protein–protein interactions to activate signalling pathways contributing to memory acquisition and consolidation (Tonegawa et al., 2015). Notably, the strength of the synaptic connections remained undisrupted up to 90 min despite the PATs inhibition after LTP induction. We hypothesize that once the consolidation period is over and memory is stable, PATs inhibition no longer affects the expression of spatial memory in both MWM and OLM during retrieval. It is now accepted that memory retrieval is not a passive process. Once a memory is retrieved, the memory trace is destabilized and molecular mechanisms like acquisition and consolidation are triggered, a process called reconsolidation (Rossato et al., 2006). Although it is still unknown, reconsolidation probably requires PATs activity to induce the plastic changes necessary to update the memory traces. Further studies are needed to shed light on these mechanisms. Additionally, experiments are necessary to understand the sex-dependent effects of PATs inhibition on learning and memory consolidation processes.

## 5. Conclusion

All in all, these findings suggest that spatial learning and memory require PATs activity through mechanisms that regulate the synaptic strength. Our work improves our understanding of the implications of a significant post-translational protein modification of learning and memory consolidation processes.

## CRedit authorship contribution statement

**Oscar Urrego-Morales:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing – original draft, Visualization, Project administration. **Elvi Gil-Lievana:** Methodology, Validation, Formal analysis, Data curation, Writing – original draft, Visualization. **Gerardo Ramirez-Mejia:** Methodology, Validation, Formal analysis, Data curation, Writing – original draft, Visualization. **Luis Francisco Rodríguez-Durán:** Formal analysis, Writing – review & editing. **Martha Lilia Escobar:** Writing – review & editing, Supervision. **Ilse Delint-Ramirez:** Writing – review & editing, Supervision. **Federico Bermúdez-Rattoni:** Resources, Writing – review & editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Data availability

Data will be made available on request.

## Acknowledgments

This work was supported by the CONACYT grant 250870, CONACYT grant FOINS 474, and DGAPA-PAPIIT-UNAM grant IN212919. Urrego-Morales O. is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received the fellowship (CVU number) 742407 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México.

## References

- Abel, T., & Lattal, K. M. (2001). Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Current Opinion in Neurobiology*, 11, 180–187. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00194-x](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00194-x)
- Balderas, I., Rodríguez-Ortiz, C., Salgado-Tonda, P., Chavez-Hurtado, J., McLaugh, J., & Bermúdez-Rattoni, F. (2008). The consolidation of object and context recognition memory involve different regions of the temporal lobe. *Learning & Memory*, 15, 618–624. <https://doi.org/10.1101/lm.1028008>
- Brigidi, G., Sun, Y., Beccano-Kelly, D., Pitman, K., Mobasser, M., Borgland, S., et al. (2014). Palmitoylation of  $\delta$ -catenin by DHHC5 mediates activity-induced synapse plasticity. *Nature Neuroscience*, 17, 522–532. <https://doi.org/10.1038/nn.3657>
- Camp, L., & Hofmann, S. (1993). Purification and properties of a palmitoyl protein thioesterase that cleaves palmitate from H-Ras. *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 22566–22574. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)41567-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)41567-0)
- Cercato, M., Vázquez, C., Kornisiuk, E., Aguirre, A., Coletti, N., Smitcofsky, M., et al. (2017). GluN1 and GluN2A NMDA Receptor Subunits Increase in the Hippocampus during Memory Consolidation in the Rat. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 10, 242. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2016.00242>
- Cho, E., & Park, M. (2016). Palmitoylation in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Pharmacological Research*, 111, 133–151. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.06.008>
- Conibear, E., & Davis, N. (2010). Palmitoylation and depalmitoylation dynamics at the glance. *Journal of Cell Science*, 123, 4007–4010. <https://doi.org/10.1242/jcs.059287>
- Davda, D., El Azzouy, M., Tom, C., Hernandez, J., Majmudar, J., Kennedy, R., et al. (2013). Profiling targets of the irreversible palmitoylation inhibitor 2-bromopalmitate. *ACS Chemical Biology*, 8, 1912–1917. <https://doi.org/10.1021/cb400380s>
- Deák, F. (2014). Neuronal vesicular trafficking and release in age-related cognitive impairment. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 69, 1325–1330. <https://doi.org/10.1093/gerona/glu061>
- Delint-Ramirez, I., Salcedo-Tello, P., & Bermúdez-Rattoni, F. (2008). Spatial memory formation induces recruitment of NMDA receptor and PSD-95 to synaptic lipid rafts. *Journal of Neurochemistry*, 106, 1658–1668. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05523.x>
- Delint-Ramirez, I., Willoughby, D., Hammond, G. R., Ayling, L. J., & Cooper, D. M. (2011). Palmitoylation targets AKAP79 protein to lipid rafts and promotes its regulation of calcium-sensitive adenylyl cyclase type 8. *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 32962–32975. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.243899>
- Dekker, F., Rocks, O., Vartak, N., Memminger, S., Hedberg, C., Balamurugan, R., et al. (2010). Small-molecule inhibition of APT1 affects Ras localization and signaling. *Nature Chem Biol*, 6, 449–456. <https://doi.org/10.1038/nchembio.362>
- Draper, J., & Smith, C. (2009). Palmitoyl acyltransferase assays and inhibitors. *Molecular Membrane Biology*, 26, 5–13. <https://doi.org/10.1080/09687680802683839>
- El-Husseini, A., Schnell, E., Dakoji, S., Sweeney, N., Zhou, Q., Prange, O., et al. (2002). Synaptic strength regulated by palmitate cycling on PSD95. *Cell*, 108, 849–863. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00683-9)
- Ernst, A., Syed, S., Zaki, O., Bottanelli, F., Zheng, H., Hacke, M., et al. (2018). S-Palmitoylation Sorts Membrane Cargo for Anterograde Transport in the Golgi. *Developmental Cell*, 47, 479–493.e7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.10.024>
- Fasshauer, D., Bruns, D., Shen, B., Jahn, R., & Brünger, A. (1997). A structural change occurs upon binding of syntaxin to SNAP-25. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 4582–4590. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.7.4582>
- Florian, C., & Roulet, P. (2004). Hippocampal CA3-region is crucial for acquisition and memory consolidation in Morris water maze task in mice. *Behavioural Brain Research*, 154, 365–374. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.03.003>
- Fukata, Y., & Fukata, M. (2010). Protein palmitoylation in neuronal development and synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*, 11, 161–175. <https://doi.org/10.1038/nrn2788>
- Fukata, M., Fukata, Y., Adesnik, H., Nicoll, R., Bredt, D. (2004). Identification of PSD-95 palmitoylating enzymes. *Neuron*, 44:987–996. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.>
- Fukata, Y., Murakami, T., Yokoi, N., & Fukata, M. (2016). Local palmitoylation cycles and specialized membrane domain organization. *Current Topics in Membranes*, 77, 97–141. <https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2015.10.003>
- Greaves, J., & Chamberlain, L. H. (2007). Palmitoylation-dependent protein sorting. *The Journal of Cell Biology*, 176, 249–254. <https://doi.org/10.1083/jcb.200610151>
- Globa, A., & Bamji, S. (2017). Protein palmitoylation in the development and plasticity of neuronal connections. *Current Opinion in Neurobiology*, 45, 210–220. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.02.016>
- Han, J., Wu, P., Wang, F., & Chen, J. (2015). S-palmitoylation regulates AMPA receptors trafficking and function: A novel insight into synaptic regulation and therapeutics. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2014.12.002>
- Hayashi, T. (2020). Post-translational palmitoylation of ionotropic glutamate receptors in excitatory synaptic functions. *British Journal of Pharmacology*, 178, 784–797. <https://doi.org/10.1111/bph.15050>
- Hayashi, T., Rumbaugh, G., & Huganir, R. L. (2005). Differential regulation of AMPA receptor subunit trafficking by palmitoylation of two distinct sites. *Neuron*, 47, 709–723. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.06.035>
- Hayashi, T., Thomas, G. M., & Huganir, R. L. (2009). Dual palmitoylation of NR2 subunits regulates NMDA receptor trafficking. *Neuron*, 64, 213–226. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.08.017>
- Hayashi Y. (2021). Molecular mechanism of hippocampal long-term potentiation - Towards multiscale understanding of learning and memory. *Neurosci Res* S0168-0102(21)00186-3. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neures.2021.08.001>



- Jennings, B., Nadolski, M., Ling, Y., Baker, M., Harrison, M., Deschenes, R., et al. (2009). 2-Bromopalmitate and 2-(2-hydroxy-5-nitro-benzylidene)-benzo-b-thiophen-3-one inhibit DHHHC-mediated palmitoylation in vitro. *Journal of Lipid Research*, 50(2), 233–242. <https://doi.org/10.1194/jlr.M800270-JLR200>
- Jeyifous, O., Lin, E., Chen, X., Antinone, S., Mastro, R., Drisdell, R., et al. (2016). Palmitoylation regulates glutamate receptor distributions in postsynaptic densities through control of PSD95 conformation and orientation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113, E8482–E8491. <https://doi.org/10.1073/pnas.1612963113>
- Ji, B., & Skup, M. (2021). Roles of palmitoylation in structural long-term synaptic plasticity. *Molecular Brain*, 14, 8. <https://doi.org/10.1186/s13041-020-00717-y>
- Kang R., Wan J., Arstikaitis P., Takahashi H., Huang K., Bailey A., Thompson J., Roth A., Drisdell R., Mastro R., Green W., Yates J., Davis N., El-Husseini A. (2008). Neural palmitoyl-proteomics reveals dynamic synaptic palmitoylation. *Nature*, 456(7224), 904–9. doi: 10.1038/nature07605. PMID: 19092927; PMCID: PMC2610860.
- Kim, K., Kim, J., Park, J., Suh, Y., Jou, I., Joe, E., et al. (2013). DJ-1 associates with lipid rafts by palmitoylation and regulates lipid rafts-dependent endocytosis in astrocytes. *Human Molecular Genetics*, 22, 4805–4817. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt332>
- Kong, E., Peng, S., Chandra, G., Sarkar, C., Zhang, Z., Bagh, M., et al. (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. *The Journal of Biological Chemistry*, 288, 9112–9125. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.421073>
- Levental, I., Lingwood, D., Grzybek, M., Coskun, U., & Simons, K. (2010). Palmitoylation regulates raft affinity for the majority of integral raft proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 22050–22054. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016184107>
- Li, Y., Hofer, K., Wong, A., Cooper, J., Birnbaum, S., Hammer, R., et al. (2010). DHHHC5 interacts with PDZ domain 3 of post-synaptic density-95 (PSD-95) protein and plays a role in learning and memory. *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 13022–13031. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.079426>
- Lin, D., & Conibear, E. (2015). Enzymatic protein depalmitoylation by acyl protein thioesterases. *Biochemical Society Transactions*, 43, 193–198. <https://doi.org/10.1042/BST20140235>
- Linder, M., & Deschenes, R. (2007). Palmitoylation: Policing protein stability and traffic. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8, 74–84. <https://doi.org/10.1038/nrm2084>. PMID: 17183362.
- Lu, W., & Roche, K. (2012). Posttranslational regulation of AMPA receptor trafficking and function. *Current Opinion in Neurobiology*, 22(3), 470–479. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.09.008>
- Lüscher, C., & Malenka, R. C. (2002). NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4, Article a005710. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005710>
- Lussier, M. P., Sanz-Clemente, A., & Roche, K. W. (2015). Dynamic Regulation of N-Methyl-D-aspartate (NMDA) and  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid (AMPA) Receptors by Posttranslational Modifications. *The Journal of Biological Chemistry*, 290, 28596–28603. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.652750>
- Matt, L., Kim, K., Chowdhury, D., & Hell, J. W. (2019). Role of palmitoylation of postsynaptic proteins in promoting synaptic plasticity. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2019(12), 8. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00008>
- Melo, H., Seixas da Silva, G., Sant'Ana, M., Teixeira, C., Clarke, J., Miya, C., et al. (2020). Palmitate Is Increased in the Cerebrospinal Fluid of Humans with Obesity and Induces Memory Impairment in Mice via Pro-inflammatory TNF- $\alpha$ . *Cell Reports*, 30. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.072>
- Meitzen, J., Britton, K., Tuomela, K., & Mermelstein, P. (2019). The expression of select genes necessary for membrane-associated estrogen receptor signaling differ by sex in adult rat hippocampus. *Steroids*. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2017.09.012>
- Milnerwood, A., Parsons, M., Young, F., Singaraja, R., Franciosi, S., Volta, M., et al. (2013). Memory and synaptic deficits in hippocampal DHHHC17 knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 20296–20301. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222384110>
- Monterino, A., & Thomas, G. (2015). Slippery signaling: Palmitoylation-dependent control of neuronal kinase location and activity. *Molecular Membrane Biology*, 32, 179–188. <https://doi.org/10.1080/09687688.2016.1182652>
- Morgado-Bernal, I. (2011). Learning and memory consolidation: Linking molecular and behavioral data. *Neurosci*, 176, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.12.056>
- Mukai, J., Dhilla, A., Drew, L. J., Stark, K. L., Cao, L., MacDermott, A. B., et al. (2008). Palmitoylation-dependent neurodevelopmental deficits in a mouse model of 22q11 microdeletion. *Nature Neuroscience*, 11, 1302–1310. <https://doi.org/10.1038/nn.2204>
- Nadolski, M. J., & Linder, M. E. (2007). Protein lipidation. *The FEBS Journal*, 274, 5202–5210. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06056.x>
- Nasseri, G., Matin, N., Wild, A., Tosefsky, K., Flibotte, S., Stacey, R., et al. (2022). Synaptic activity-dependent changes in the hippocampal palmitoylome. *Science Signaling*, 15(ead2519), 1–18. <https://doi.org/10.1126/scisignal.ead2519>
- Noritake, J., Fukata, Y., Iwanaga, T., Hosomi, N., Tsutsumi, R., Matsuda, N., et al. (2009). Mobile DHHHC palmitoylating enzyme mediates activity-sensitive synaptic targeting of PSD-95. *The Journal of Cell Biology*, 186, 147–160. <https://doi.org/10.1083/jcb.200903101>
- Paxinos, G., Watson C. (1996). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, New York, third edition.
- Pedro, M., Vilcaes, A., Tomatis, V., Oliveira, R., Gomez, G., & Daniotti, J. (2013). 2-Bromopalmitate reduces protein deacylation by inhibition of acyl-protein thioesterase enzymatic activity. *PLoS One*, 8(10), 1–11.
- Prescott, G., Gorleku, O., Greaves, J., & Chamberlain, L. (2009). Palmitoylation of the synaptic vesicle fusion machinery. *Journal of Neurochemistry*, 110, 1135–1149. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06205.x>
- Reiner, A., & Levitz, J. (2018). Glutamatergic signaling in the central nervous system: Tonic and metabotropic receptors in concert. *Neuron*, 98, 1080–1098. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.05.018>
- Rocks, O., Gerauer, M., Vartak, N., Koch, S., Huang, Z. P., Pechlivanis, M., et al. (2010). The palmitoylation machinery is a spatially organizing system for peripheral membrane proteins. *Cell*, 141, 458–471. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.007>
- Rosenberg, T., Gal-Ben-Ari, S., Dieterich, D., Kreutz, M., Ziv, N., Gundelfinger, E., et al. (2014). The roles of protein expression in synaptic plasticity and memory consolidation. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 7, 86. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00086>
- Rossato, J., Bevilacqua, L., Medina, J., Izquierdo, I., & Cammarota, M. (2006). Retrieval induces hippocampal-dependent reconsolidation of spatial memory. *Learning & Memory*, 13, 431–440. <https://doi.org/10.1101/lm.315206>
- Salaun, C., Greaves, J., & Chamberlain, L. H. (2010). The intracellular dynamic of protein palmitoylation. *The Journal of Cell Biology*, 191, 1229–1238. <https://doi.org/10.1083/jcb.201008160>
- Shimell, J. J., Globa, A., Sepers, M. D., Wild, A. R., Matin, N., Raymond, L. A., et al. (2021). Regulation of hippocampal excitatory synapses by the Zdhhc5 palmitoyl acyltransferase. *Journal of Cell Science*, 134, jcs254276. <https://doi.org/10.1242/jcs.254276>
- Sohn, H., & Park, M. (2019). Palmitoylation-mediated synaptic regulation of AMPA receptor trafficking and function. *Archives of Pharmacological Research*, 42, 426–435. <https://doi.org/10.1007/s12272-019-01134-z>
- Spinelli, M., Fusco, S., Mainardi, M., Scala, F., Natale, F., Lapenta, R., et al. (2017). Brain insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and memory by increasing GluA1 palmitoylation through FoxO3a. *Nature Communications*, 8, 2009. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02221-9>
- Susman, L., Brenner, N., & Barak, O. (2019). Stable memory with unstable synapses. *Nature Communications*, 10, 4441. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12306-2>
- Takeuchi, T., Duszkiewicz, A. J., & Morris, R. G. (2013). The synaptic plasticity and memory hypothesis: Encoding, storage and persistence. *Lond. B Biol. Sci.*, 369, 20130288. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0288>. Philos. Trans. R. Soc.
- Thomas, G. M., & Haganir, R. L. (2013). Palmitoylation-dependent regulation of glutamate receptors and their PDZ domain-containing partners. *Biochemical Society Transactions*, 41, 72–78. <https://doi.org/10.1042/BST20120223>
- Tonegawa, S., Pignatelli, M., Roy, D., & Ryan, T. (2015). Memory engram storage and retrieval. *Current Opinion in Neurobiology*, 35, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.07.009>
- Tonn K, Woolfrey K, Swanson S, Schnell S, Meitzen J, Dell'Acqua M, Mermelstein P. (2018). Palmitoylation of caveolin-1 is regulated by the same DHHHC acyltransferases that modify steroid hormone receptors. *Cell Biology*. 293(41): 15901-15911. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004167>.
- Traynelis, S., Wollmuth, L., McBain, C., Menniti, F., Vance, K., Ogden, K., et al. (2010). Glutamate receptor ion channels: Structure, regulation, and function. *Pharmacological Reviews*, 62, 405–496. <https://doi.org/10.1124/pr.109.002451>
- Van Dolah, D., Mao, L., Shaffer, C., Guo, M., Fibuch, E., Chu, X., et al. (2011). Reversible palmitoylation regulates surface stability of AMPA receptors in the nucleus accumbens in response to cocaine in vivo. *Biological Psychiatry*, 69, 1035–1042. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.11.025>
- Vartak, N., Papke, B., Grecco, H., Rossmannek, L., Waldmann, H., Hedberg, C., et al. (2014). The autodepalmitoylating activity of APT maintains the spatial organization of palmitoylated membrane proteins. *Biophysical Journal*, 106, 93–105. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.11.024>
- Veit, M., Becher, A., & Ahnert-Hilger, G. (2000). Synaptobrevin 2 is palmitoylated in synaptic vesicles prepared from adult, but not from embryonic brain. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 15, 408–416. <https://doi.org/10.1006/mcne.1999.0830>
- Webb, Y., Hermida-Matsumoto, L., & Resh, M. (2000). Inhibition of protein palmitoylation, raft localization, and T cell signaling by 2-bromopalmitate and polyunsaturated fatty acids. *Cell Biology and Metabolism*, 275(1), 261–270. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.1.261>
- 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. *Behavioural Brain Research*, 28, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.05.006>
- Yamazaki, M., Fukaya, M., Abe, M., Ikeno, K., Kakizaki, T., Watanabe, M., et al. (2001). Differential palmitoylation of two mouse glutamate receptor interacting protein 1 forms with different N-terminal sequences. *Neuroscience Letters*, 304, 81–84. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(01\)01766-9](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(01)01766-9)
- Yokoi, N., Fukata, Y., Sekiya, A., Murakami, T., Kobayashi, K., & Fukata, M. (2016). Identification of PSD-95 depalmitoylating enzymes. *The Journal of Neuroscience*, 36, 6431–6444. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0419-16.2016>
- Zareba-Kozioł, M., Figiel, I., Bartkowiak-Kaczmarek, A., & Włodarczyk, J. (2018). Insights into protein S-palmitoylation in synaptic plasticity and neurological disorders: Potential and limitations of methods for detection and analysis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 175. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00175>
- Zareba-Kozioł M, Bartkowiak-Kaczmarek A, Roszkowska M, Bijata K, Figiel I, Halder A, Kamińska P, Müller F, Basu S, Zhang W, et al. (2021). S-Palmitoylation of Synaptic Proteins as a Novel Mechanism Underlying Sex-Dependent Differences in Neuronal Plasticity. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 6253. <https://doi.org/10.3390/ijms22126253>.

Durante la estancia de doctorado, también se obtuvieron las siguientes publicaciones.

Neuropharmacology 187 (2021) 108493



Contents lists available at ScienceDirect

Neuropharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/neuropharm](http://www.elsevier.com/locate/neuropharm)



## Class I HDAC inhibition improves object recognition memory consolidation through BDNF/TrkB pathway in a time-dependent manner

Gerardo Ramirez Mejia<sup>a</sup>, Elvi Gil Lievana<sup>a</sup>, Oscar Urrego Morales<sup>a</sup>, Ernesto Soto Reyes<sup>b</sup>, Federico Bermúdez-Rattoni<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, Ciudad de México

<sup>b</sup> Departamento de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajalajara, 05248, Ciudad de México

### ARTICLE INFO

#### Keywords

HDAC inhibitor

Consolidation

BDNF

TrkB

Object recognition memory

### ABSTRACT

There is increasing evidence showing that HDACs regulates BDNF (brain-derived neurotrophic factor) expression through its interaction with the *Bdnf* gene promoter, a key regulator to consolidate memory. Although the nuclear mechanisms regulated by HDACs that control BDNF expression have been partially described recently, the temporal events for memory consolidation remain unknown. Hence, in this work, we studied the temporal pattern for the activation of the BDNF/TrkB pathway through class I HDAC inhibition to enhance object recognition memory (ORM) consolidation. To this end, we inhibited class I HDAC in the insular cortex (IC) and a weak ORM protocol was used to assess temporal expression and function of the BDNF/TrkB pathway in the IC. We found that cortical class I HDAC inhibition enhanced long-term ORM, coincident with a clear peak of BDNF expression at 4 h after acquisition. Furthermore, the tyrosine kinase B (TrkB) receptor blockade at 4 h, but not at 8 h, impaired the consolidation of ORM. These results suggest that histone acetylation regulates the temporal expression of BDNF in cortical circuits potentiating the long-term recognition memory.

### 1. Introduction

Memory consolidation is the process in which newly acquired, fragile information is integrated and stabilized into long-term memory (McGaugh, 2000). To this end, stimuli entrance during learning process drives activation of signaling pathways into neuronal circuits to induce different epigenetic mechanisms, such as histone acetylation to promote gene expression and *de novo* protein synthesis, a pivotal mechanism for memory consolidation (Levenson and Sweatt, 2005, 2006; Day and Sweatt 2011; Jarome and Helmstetter, 2014). Moreover, the strength of stimuli determines the neuronal activity including, neurotransmitter release, signaling pathways activation and firing rate that regulates histones acetylation turnover (Uehida et al., 2017; Tyssowski et al., 2018). It has been reported that expression of several memory-related genes is regulated by histones acetylation/deacetylation mechanisms. Two main enzymes participate in this process: histone acetyltransferase (HAT) that acetylates the N-terminal domain of histones to relax chromatin and promote gene expression. Contrarily, histone deacetylase (HDAC) removes acetyl groups from the N-terminal domains,

suppressing gene expression (Marmorstein and Zhou, 2014; Seto and Yoshida, 2014). HDACs are classified into four different groups: class I (including HDAC1, 2, 3, and 8), II (HDAC4-7, 9, and 10), III (Sirt1-7), and IV (HDAC11), but recently class I HDACs seem to be relevant for memory processes (Guan et al., 2009; McQuown et al., 2011; Bahari et al., 2012). It has been demonstrated that HDACs activity depends on the strength of the stimuli and its inhibition boosts histone acetylation after training to consolidate long-term memory (LTM; Peleg et al., 2010; Uehida et al., 2017). In this regard, HDACs activity negatively regulates memory consolidation and synaptic plasticity (Guan et al., 2009; Gräff and Tsai 2013). Although systemic and intracerebral administration of unspecific HDAC inhibitors does not affect consolidation of behavioral tasks in strong training (Bahari-Javan et al., 2012; Núñez-Jaramillo et al., 2013), it enhances the consolidation of weak object recognition memory (ORM) through chromatin relaxation to induce gene expression and protein synthesis (Stefanko et al., 2009; Roozendaal et al., 2010; Hawk et al., 2011; Chen et al., 2018). Studies report ORM, an IC-dependent task, as a reliable behavioral model to study molecular events associated with memory enhancement without altering the motivational component (food or water deprivation, reward and

\* Corresponding author. Laboratory BL-201, División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510, Ciudad de México.

E-mail address: [fbermudez@icm.unam.mx](mailto:fbermudez@icm.unam.mx) (F. Bermúdez-Rattoni).

<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108493>

Received 19 August 2020; Received in revised form 26 January 2021; Accepted 5 February 2021

Available online 11 February 2021

0028-3908/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.





# Photostimulation of Ventral Tegmental Area-Insular Cortex Dopaminergic Inputs Enhances the Salience to Consolidate Aversive Taste Recognition Memory via D1-Like Receptors

Elvi Gil-Lievana<sup>1</sup>, Gerardo Ramirez-Mejia<sup>1</sup>, Oscar Urrego-Morales<sup>1</sup>, Jorge Luis-Islas<sup>2</sup>, Ranier Gutierrez<sup>2</sup> and Federico Bermúdez-Rattoni<sup>1\*</sup>

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Shen Mizumori,  
University of Washington,  
United States

### Reviewed by:

Matthew Wanat,  
University of Texas at San Antonio,  
United States  
Anna K. Radke,  
Miami University, United States

### \*Correspondence:

Federico Bermúdez-Rattoni  
fbermude@fnc.unam.mx

### Specialty section:

This article was submitted to  
Cellular Neurophysiology,  
a section of the journal  
Frontiers in Cellular Neuroscience

Received: 28 November 2021

Accepted: 08 February 2022

Published: 11 March 2022

### Citation:

Gil-Lievana E, Ramirez-Mejia G,  
Urrego-Morales O, Luis-Islas J,  
Gutierrez R and Bermúdez-Rattoni F  
(2022) Photostimulation of Ventral  
Tegmental Area-Insular Cortex  
Dopaminergic Inputs Enhances  
the Salience to Consolidate Aversive  
Taste Recognition Memory via  
D1-Like Receptors.  
Front. Cell. Neurosci. 16:823220.  
doi: 10.3389/fncel.2022.823220

<sup>1</sup> Instituto de Fisiología Celular, División de Neurociencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico,  
<sup>2</sup> Laboratory of Neurobiology of Appetitive, Department of Pharmacology, Center for Research and Advanced Studies of the  
National Polytechnic Institute, CINVESTAV, Mexico City, Mexico

Taste memory involves storing information through plasticity changes in the neural network of taste, including the insular cortex (IC) and ventral tegmental area (VTA), a critical provider of dopamine. Although a VTA-IC dopaminergic pathway has been demonstrated, its role to consolidate taste recognition memory remains poorly understood. We found that photostimulation of dopaminergic neurons in the VTA or VTA-IC dopaminergic terminals of TH-Cre mice improves the salience to consolidate a subthreshold novel taste stimulus regardless of its hedonic value, without altering their taste palatability. Importantly, the inhibition of the D1-like receptor into the IC impairs the salience to facilitate consolidation of an aversive taste recognition memory. Finally, our results showed that VTA photostimulation improves the salience to consolidate a conditioned taste aversion memory through the D1-like receptor into the IC. It is concluded that the dopamine activity from the VTA into IC is required to increase the salience enabling the consolidation of a taste recognition memory. Notably, the D1-like receptor activity into the IC is required to consolidate both innate and learned aversive taste memories but not appetitive taste memory.

**Keywords:** insular cortex, ventral tegmental area, salience, consolidation, aversive taste, D1-like receptor

## INTRODUCTION

Taste memory evolves as a critical system for animal survival through the detection of taste attributes related to the hedonic value, degree of familiarity, and to remember their nutritive or toxic consequences of food to form a memory for future acceptance or avoidance responses (Bermúdez-Rattoni, 2004; Scott, 2005). Taste memory involves encoding, storing, and retrieving taste information due to neural plastic changes taking place in a complex network comprising many different brain areas, encompassing the insular cortex (IC), medial prefrontal cortex, basolateral



## Saliency to remember: VTA-IC dopaminergic pathway activity is necessary for object recognition memory formation

Gerardo Ramírez Mejía<sup>a</sup>, Elvi Gil Lievana<sup>a</sup>, Oscar Urrego Morales<sup>a</sup>, Donovan Galvez Marquez<sup>a</sup>, Eduardo Hernández-Ortiz<sup>a</sup>, José Alberto Carrillo-Lorenzo<sup>a</sup>, Federico Bermúdez-Rattoni<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, Mexico City, Mexico

### ARTICLE INFO

Handling Editor: Thomas Götzl

#### Keywords:

Insular cortex  
Ventral tegmental area  
Acquisition  
Object recognition memory  
D1 like receptor

### ABSTRACT

Previous studies have shown that dopaminergic activity modulates the saliency of novel stimuli enabling the formation of recognition memories. In this work, we hypothesize that dopamine released into the insular cortex (IC) from the ventral tegmental area (VTA) inputs enables the acquisition to consolidate object recognition memory. It has been reported that short training produces weak recognition memories; on the contrary, longer training produces lasting and robust recognition memories. Using a Cre recombinase under the tyrosine hydroxylase (TH) promoter mouse model, we photostimulated the VTA-IC dopaminergic pathway during short training or photoinhibited the same pathway during long training while mice explored objects. Our results showed that the photostimulation of the VTA-IC pathway during a short training enables the acquisition of recognition memory. Conversely, photoinhibition of the same pathway during a long training prevents the acquisition of recognition memory. Interestingly, the exploration time of the objects under photoinhibition or photostimulation of the dopaminergic VTA-IC pathway was not altered. Significantly, this enhancement of acquisition of the object recognition memory through the photostimulation of the VTA dopaminergic neurons could be impaired by the blockage of the D1 like receptors into the IC, either before or after the photostimulation. Altogether, our results suggest that dopamine released by the VTA is required during the acquisition to consolidate the object recognition memory through D1 like receptors into the IC without affecting the activity or the motivation to explore objects.

### 1. Introduction

The saliency of stimuli such as objects, faces and events is essential for several cognitive processes, including memory formation. The more prominent a stimulus or event is, the more likely it is to be acquired and consolidated into long-term memory (McGaugh, 2013). The ability to distinguish a stimulus that has been previously experienced is called recognition memory (Mandler and Rabinowitz, 1981; Albasser et al., 2011; Das et al., 2019; Yonelinas et al., 2010). The recognition memory is believed to require different neuronal networks in specific temporal lobe regions (Bermúdez-Rattoni, 2014; Balderas et al., 2015). In this regard, recognition memories, such as for faces, but not for locations, have altered activity in the posterior cingulate cortex, insular cortex and upper frontal cortex in a human study using fMRI (Passaro et al., 2013).

Similarly, Balderas and coworkers showed that cortical structures, including the insular cortex, are necessary to consolidate object recognition memory (ORM) in rodents (Balderas et al., 2008).

Dopamine is a critical neurotransmitter to encode saliency of stimuli, which has been vastly investigated. There is a wealth of literature about the modulatory effects of dopamine activity on neural plasticity and its contribution to forming long-term memory (de Lima et al., 2011; Morikawa and Paladini, 2011). The effects of the dopaminergic activity in the ORM task have been evaluated with the systemic administration of agonists and antagonists of D1 and D2 receptors immediately after the training phase (de Lima et al., 2011). The selective agonist of D1 receptors SKF38393, and the non-selective agonist apomorphine, improve long-term memory assessed 24 and 72 h after training. Furthermore, using a weak learning protocol under a cortical D1 receptors agonist

**Abbreviations:** ChR2, channelrhodopsin-2 protein; D1-like receptors, dopamine subtype 1/5 receptors; eYFP, enhanced yellow fluorescent protein; IC, insular cortex; LTM, long term memory; NpHR, halorhodopsin; ORM, object recognition memory; TH, tyrosine hydroxylase; VTA, Ventral tegmental area.

\* Corresponding author. División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, 04510, México City, México.

E-mail address: [bermudez@icfanam.mx](mailto:bermudez@icfanam.mx) (F. Bermúdez-Rattoni).

<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2023.109464>

Received 22 July 2022; Received in revised form 8 February 2023; Accepted 9 February 2023

Available online 15 February 2023

0028-3908/© 2023 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## Permisos de reproducción y adaptación de figuras

Figura 1



### Thank you for your order!

Dear Mr. Oscar Urrego Morales,

Thank you for placing your order through Copyright Clearance Center's RightsLink® service.

#### Order Summary

Licensee:	Mr. Oscar Urrego Morales
Order Date:	Oct 20, 2023
Order Number:	5652871487939
Publication:	Current Opinion in Chemical Biology
Title:	Synthetic protein lipidation
Type of Use:	reuse in a thesis/dissertation
Order Total:	0.00 USD

View or print complete [details](#) of your order and the publisher's terms and conditions.

Sincerely,

Copyright Clearance Center

## Figura 2



Our Ref: imbc/03461057

10/20/2023

Dear Requester,

Thank you for your correspondence requesting permission to reproduce content from a Taylor & Francis Group journal content in your thesis to be posted on your university's repository.

We will be pleased to grant free permission on the condition that your acknowledgement must be included showing article title, author, full Journal title, and © **copyright # [year]**, reprinted by permission of Informa UK Limited, trading as Taylor & Taylor & Francis Group, <http://www.tandfonline.com>

**This permission does not cover any third party copyrighted work which may appear in the article by permission. Please ensure you have checked all original source details for the rights holder and if need apply for permission from the original rights holder.**

Please note that this license **does not allow you to post our content on any other third-party websites.**

**Please note permission does not provide access to our article**, if you are affiliated to an institution and your institution holds a subscription to the content you are requesting you will be able to view the article free of charge, if your institution does not hold a subscription or you are not affiliated to an institution that has a subscription then you will need to purchase this for your own personal use as we do not provide our articles free of charge for research.

Thank you for your interest in our Journal.

With best wishes,

Taylor & Francis Journal Permissions

Web: [www.tandfonline.com](http://www.tandfonline.com)

4 Park Square, Milton Park, Abingdon, OX14 4RN  
( +44 (0)20 8052 0600

## Figura 3

### Profiling Targets of the Irreversible Palmitoylation Inhibitor 2-Bromopalmitate

Author: Dahvid Davda, Mahmoud A. El Azzouny, Christopher T.M.B. Tom, et al

Publication: ACS Chemical Biology

Publisher: American Chemical Society

Date: Sep 1, 2013

Copyright © 2013, American Chemical Society



#### PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from {COMPLETE REFERENCE CITATION}. Copyright {YEAR} American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.



Figura 4

**SPRINGER NATURE**

**Thank you for your order!**

Dear Mr. Oscar Urrego Morales,

Thank you for placing your order through Copyright Clearance Center's RightsLink® service.

**Order Summary**

Licensee: Mr. Oscar Urrego Morales  
Order Date: Oct 20, 2023  
Order Number: 5652881395170  
Publication: Nature Reviews Neuroscience  
Title: Protein palmitoylation in neuronal development and synaptic plasticity  
Type of Use: Thesis/Dissertation  
Order Total: 0.00 USD

View or print complete [details](#) of your order and the publisher's terms and conditions.

Sincerely,

Copyright Clearance Center

Figura 5

**SPRINGER NATURE**

### Thank you for your order!

Dear Mr. Oscar Urrego Morales,

Thank you for placing your order through Copyright Clearance Center's RightsLink® service.

#### Order Summary

Licensee: Mr. Oscar Urrego Morales  
Order Date: Oct 20, 2023  
Order Number: 5652890109502  
Publication: Nature Reviews Neuroscience  
Title: Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality  
Type of Use: Thesis/Dissertation  
Order Total: 0.00 USD

View or print complete [details](#) of your order and the publisher's terms and conditions.

Sincerely,

Copyright Clearance Center