UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

Estudio de la acetilación de proteínas sinápticas durante la consolidación de la memoria de largo término en ratón

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Lic. Ricardo Sebastián Rivas

Director de Tesis: Dr. Ramiro Freudenthal

Consejero de Estudios: Dr. Arturo Romano

Lugar de trabajo: Instituto de Biociencias, Biotecnología y Biología traslacional (iB3 - UBA)

Tesis defendida el 15 de mayo de 2024

Buenos Aires, 2024

Agradecimientos

Todos estos años han sido de mucho trabajo y crecimiento, que pude lograr gracias al acompañamiento de muchas personas y a la gracia de Dios.

Agradezco a la FCEN y a la UBA por brindarme educación pública, gratuita y de calidad. Agradezco a CONICET por financiar este proyecto. No lo hubiera podido hacer de otra manera.

Agradezco a Ramiro, mi director, por aceptarme para este proyecto y acompañarme. Me ayudaste a formarme como científico y también como persona.

Agradezco a la gente del Laboratorio de Memoria, siempre dispuestos a ayudarme y con quienes ha sido placentero compartir estos años: Santi, Cande, Agus, Lei, Marian, Artur y Vero. Una mención especial a Aye, por haberme hablado en aquel congreso en Misiones, que desencadeno todo esto.

Agradezco a la hermosa comunidad del iB3, que han hecho del Instituto un hermoso lugar para trabajar, crecer y divertirse. Agradezco especialmente a Gabi, por todo lo que aportaste a este proyecto con tu trabajo y por la amistad que pudimos desarrollar.

Gracias a Yae, mi esposa y compañera de cada día. Gracias por estar al pie del cañón siempre, por escuchar mis ñoñadas, por alentarme, por orar por mí y conmigo. Te amo.

Gracias a mi familia, acompañando desde Misiones pero sintiéndolos cerca; ma, pa, Ale, Esteban, Sil, Jose, Ima, Juan, Mar. Gracias a mi familia acá en Buenos Aires, que me recibieron desde el día uno y han estado atentos a mi siempre: Elda, Fer, Lou, Topo y Lili.

Gracias a mis amigos de Iglesia de la Familia. Especialmente a Pau y Lucas, por estar tan cerca y bendecir a mi familia con su amistad.

Gracias a la familia de Cru, especialmente a Charly y Andrea.

Gracias a los Chicuelos, Flor, Ro, Pri y Franco, juntos desde el día uno. Los quiero.

Resumen:
La formación de una memoria de largo término implica que dicha memoria atraviese un proceso de consolidación, el cual implica cambios moleculares como ser las modificaciones postraduccionales de proteínas, tales como fosforilación y acetilación, entre otras. En este marco, se advierte que el uso de inhibidores de deacetilasas afecta la consolidación de memorias y que los cambios en los niveles de acetilación de proteínas sinápticas influyen en los procesos de plasticidad, como ser la potenciación de largo término (LTP). En la presente tesis nos propusimos investigar la modulación de los niveles de acetilación durante la consolidación de la memoria de evitación inhibitoria en ratones, como así también su posible regulación sobre la composición sináptica. Asimismo, analizamos los cambios en los niveles de acetilación asociados a la plasticidad tras inducir una LTP químico (LTPq) en cultivos primarios de neuronas de hipocampo de ratón. Encontramos que la administración intrahipocampal de Tubastatina A (inhibidor especifico de lo deacetilasa citoplasmática KDAC6) facilita la consolidación de la memoria de evitación inhibitoria; este efecto se observa cuando la droga es administrada inmediatamente después de la adquisición, pero no 3 horas más tarde. Esto indica que la inhibición hipocampal de KDAC6 es suficiente para facilitar la memoria estudiada. Observamos también un aumento en los niveles globales de acetilación de tubulina, pero no de la lisina 40 de la misma proteína en extractos hipocampales obtenidos 45 minutos después del entrenamiento. Esto sugiere una regulación diferencial de la acetilación de los residuos de lisina de tubulina durante la consolidación. Finalmente, registramos cambios en los niveles de acetilación dendrítica y sináptica y de la densidad de la proteína de la densidad posináptica PSD95, tras inducir una LTPq en células cultivadas de hipocampo de ratón, siendo posible una regulación entre los cambios mencionados. Concluimos que la acetilación de tubulina es modulada durante la consolidación de la memoria de evitación inhibitoria en ratones.

Palabras clave: memoria de largo término, consolidación, acetilación, hipocampo, sinapsis.

Study of the acetylation of synaptic proteins during the consolidation of long-term memory in mice

Abstract:

The formation of a long-term memory implies a process known as consolidation, which involves molecular changes such as post-translational modifications of proteins, such as phosphorylation and acetylation, among others. In this framework, it is noted that the use of deacetylase inhibitors affects the consolidation of memories and that changes in the acetylation levels of synaptic proteins influence plasticity processes, such as long-term potentiation (LTP). In the present thesis we set out to investigate the modulation of acetylation levels during the consolidation of inhibitory avoidance memory in mice, as well as its possible regulation on synaptic composition. Likewise, we analyzed the changes in acetylation levels associated with plasticity after inducing chemical LTP (cLTP) in primary cultures of mouse hippocampal neurons. We found that intrahippocampal administration of Tubastatin A (specific inhibitor of the cytoplasmic deacetylase KDAC6) facilitates the consolidation of inhibitory avoidance memory; This effect is observed when the drug is administered immediately after acquisition, but not 3 hours later. This indicates that hippocampal inhibition of KDAC6 is sufficient to facilitate the memory studied. We also observed an increase in global levels of tubulin acetylation, but not of lysine 40 of the same protein in hippocampal extracts obtained 45 minutes after training. This suggests differential regulation of acetylation of tubulin lysine residues during consolidation. Finally, we recorded changes in the levels of dendritic and synaptic acetylation, and PSD95 density after inducing cLTP in cultured mouse hippocampal cells, a regulation between the aforementioned changes being possible. We conclude that tubulin acetylation is modulated during the consolidation of inhibitory avoidance memory in mice.

Keywords: long-term memory, consolidation, acetylation, hippocampus, synapsis.

Índice

1 Capítulo 1: Introducción general 6

1.1 Aprendizaje y memoria 6

1.2 El proceso de consolidación 7

1.3 Composición sináptica 9

1.4 Acetilación postraduccional de proteínas 10

1.5 Objetivos 10

1.6 Hipótesis 11

2 Capítulo 2: Efecto de la inhibición de KDAC6 y KATs sobre la consolidación de la memoria de largo término 12

2.1 Introducción 12
2.1.1 KATs y KDACs 12
2.1.2 KDAC6 14
2.1.3 Inhibidores de KATs y KDACs 15
2.1.4 Acetilación y memoria 16
2.1.5 La tarea de evitación inhibitoria 18

2.2 Materiales y métodos 19
2.2.1 Animales 19
2.2.2 Cirugía 19
2.2.3 Drogas 20
2.2.4 Evitación inhibitoria 20
2.2.5 Extracto de proteínas hipocampales 21
2.2.6 Western blot 22
2.2.7 Análisis estadístico 23

2.3 Resultados 24
2.3.1 Especificidad del efecto de la inhibición de KDAC6 24
2.3.2 Efecto de la inhibición de KATs 29

2.4 Discusión 32

3 Capítulo 3: Modulación de la acetilación de tubulina hipocampal 36

3.1 Introducción 36
3.1.1 Microtúbulos y tubulina 36
3.1.2 Rol de los MT en plasticidad sináptica y memoria 39
3.1.3 Proteína de densidad posináptica 95 (PSD95) 40

3.2 Materiales y métodos 41
3.2.1 Animales 41
3.2.2 Drogas 42
3.2.3 Evitación inhibitoria 42
3.2.4 Extractos de proteínas hipocampales 42
3.2.5 Western blot 43
3.2.6 Análisis estadístico 43

3.3 Resultados 44

3.3.1 Capacidad de los inhibidores de KDACs de preservar la acetilación de tubulina 45
3.3.2 Estudios bioquímicos durante la consolidación de la memoria 49
3.4 Discusión 53

4 Capítulo 4: Cambios en la acetilación y composición sináptica inducidos por LTP *in vitro* 57

4.1 Introducción 57
4.1.1 Potenciación de largo término 57
4.1.2 LTP, acetilación y composición sináptica 58
4.1.3 Inducción de la LTP in vitro 59
4.2 Materiales y métodos 60
4.2.1 Animales 60
4.2.2 Cultivos primarios, estimulación e inmunofluorescencia 60
4.2.3 Extractos de proteínas de cultivos primarios e inmunodetección 62
4.2.4 Análisis estadístico 63
4.3 Resultados 63
4.3.1 Efectos de la LTPq sobre la señal de AcLys 65
4.3.2 Efectos de la LTPq sobre la señal de PSD95 67
4.3.3 Efectos de la LTPq sobre la señal de sinapsina 70
4.3.4 Colocalización de AcLys con PSD95 73
4.3.5 Colocalización de AcLys con sinapsina 76
4.4 Discusión 80

5 Capítulo 5: Discusión general y conclusiones 82

6 Referencias 85

7 Apéndices 97

7.1 Abreviaturas 97
7.2 Índice de figuras 97

Capítulo 1: Introducción general

1.1 Aprendizaje y memoria

En su uso coloquial, los conceptos “memoria” y “aprendizaje” son fácilmente confundibles entre sí. En este trabajo adoptamos las definiciones funcionales de David Sweatt: aprendizaje es la adquisición de una respuesta alterada a un estímulo ambiental y memoria es el proceso de almacenamiento de esa información adquirida. Estas son definiciones funcionales porque están basadas en aplicaciones experimentales (Sweatt, 2010). En los experimentos comportamentales que se expondrán, se considera expresión de una memoria a la mayor latencia de entrada a un compartimiento oscuro por parte de un ratón en una segunda exposición a ese dispositivo en relación a su latencia en la primera exposición. Este punto será retomado con más detalle en el próximo capitulo.

La memoria puede clasificarse de acuerdo al curso temporal del almacenamiento en memoria de corto y de largo término. La primera tiene una duración que va desde los segundos a minutos y su formación es independiente de síntesis de proteínas; la segunda tiene una duración que va desde los minutos hasta años, incluso toda la vida de un individuo, y su formación depende de expresión génica y síntesis de proteínas. Además, las memorias de largo término pueden subclasificarse en memorias implícitas, las cuales se expresan automáticamente e involucran poco procesamiento consciente, y explícitas. Las memorias explícitas se subclasifican en semánticas, memorias acerca de hechos, y en episódicas, memorias acerca de experiencias personales (Kandel et al., 2013a).

El proceso de formación de una memoria de largo término presenta diferentes fases. La primera fase es la de codificación, donde la información adquirida es codificada por el sistema nervioso. La segunda fase es la de consolidación, una serie de procesos celulares y moleculares que tienen lugar por algún período de tiempo luego de la codificación y que son necesarios para el establecimiento duradero en el tiempo de la memoria. La tercera fase es la de evocación, que consiste en la expresión de la memoria almacenada. Si bien no alcanza a lo tratado en esta tesis, podemos mencionar otra fase que puede tener lugar, la labilización. La misma consiste, justamente, en la labilización de una memoria previamente consolidada tras su evocación. Luego, la memoria puede tener dos destinos: la reconsolidación, la cual vuelve a estabilizar a la memoria en el tiempo con la posibilidad de haber sido modificada, o la extinción (Sweatt, 2010).

1.2 El proceso de consolidación

La consolidación es el proceso que convierte una memoria lábil en una duradera en el tiempo. Generalmente, y en esta tesis, cuando se habla de consolidación se hace referencia a un proceso que inicia en la adquisición y dura algunas horas; se la denomina consolidación celular. Existe otro tipo de consolidación denominada sistémica, la cual es más prolongada en el tiempo y, a diferencia de la anterior, es más bien independiente del hipocampo (Squire et al., 2015).

Un abordaje experimental ampliamente utilizado para el estudio de la consolidación de la memoria ha sido la administración de fármacos a distintos tiempos desde la adquisición. Así, por ejemplo, se descubrió que la administración de anisomicina A (un inhibidor de la síntesis proteica) en la amígdala, inmediatamente después de un condicionamiento de miedo en ratas, producía amnesia evaluada a las 24 horas desde la adquisición. Un efecto similar se observaba tras administrar un inhibidor de la proteína quinasa A (PKA, por sus siglas en inglés). Ambos inhibidores carecían de efecto al ser administrados 6 horas después de la adquisición (Schafe & LeDoux, 2000). De forma similar, la administración intrahipocampal del antagonista del receptor de glutamato tipo ácido N-metil-D-aspártico (NMDA, por sus siglas en inglés), el ácido-2-amino-5-fosfonovaleriánico (APV, por sus siglas en inglés), inmediatamente después del entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria mostró efecto amnésico (Roesler et al., 1998). También se describieron efectos facilitadores de la consolidación de la memoria de largo término; la administración de cafeína en una tarea de discriminación visual, la administración de una anticolinesterasa en una tarea espacial y, más recientemente, la administración de un inhibidor de deacetilasas en una tarea de reconocimiento de objeto (Federman et al., 2013; W. Paré, 1961; Stratton & Petrinovich, 1963). Al día de hoy se han caracterizado los requerimientos de la consolidación en distintas áreas del cerebro como el hipocampo, la amígdala y la corteza prefrontal (Freudenthal et al., 2005; Knowlton & Fanselow, 1998; McIntyre et al., 2003; Nieuwenhuis & Takashima, 2011; D. Paré, 2003; Salles et al., 2017).

Una de las primeras regiones del cerebro asociadas a la formación de memorias ha sido el hipocampo. Hoy en día se sabe que esta estructura es clave en la formación y la consolidación de memorias, especialmente aquellas que tienen un componente espacial. En la **Figura 1** se muestra la ubicación del hipocampo en el cerebro de rata y se diagraman las conexiones intrahipocampales. Se observa que el hipocampo ocupa un porcentaje significativo del cerebro anterior y se reconocen 3 partes, una dorsal, una ventral y una posterior. Una gran proporción de los estudios sobre el rol del hipocampo en la consolidación se enfocan en su porción dorsal. El principal tipo celular en las

regiones CA1 y CA3 son las neuronas piramidales, las cuales presentan extensas arborizaciones dendríticas. En el giro dentado se encuentran las células granulares, las cuales reciben aferencias desde la corteza entorrinal y proyectan sus axones hacia las dendritas de la región CA3 (fibras musgosas). A su vez, las neuronas piramidales de CA3 proyectan sus axones hacía las dendritas de las neuronas piramidales en CA1 (colaterales de Schaffer) (O'Keefe & Nadel, 1978).

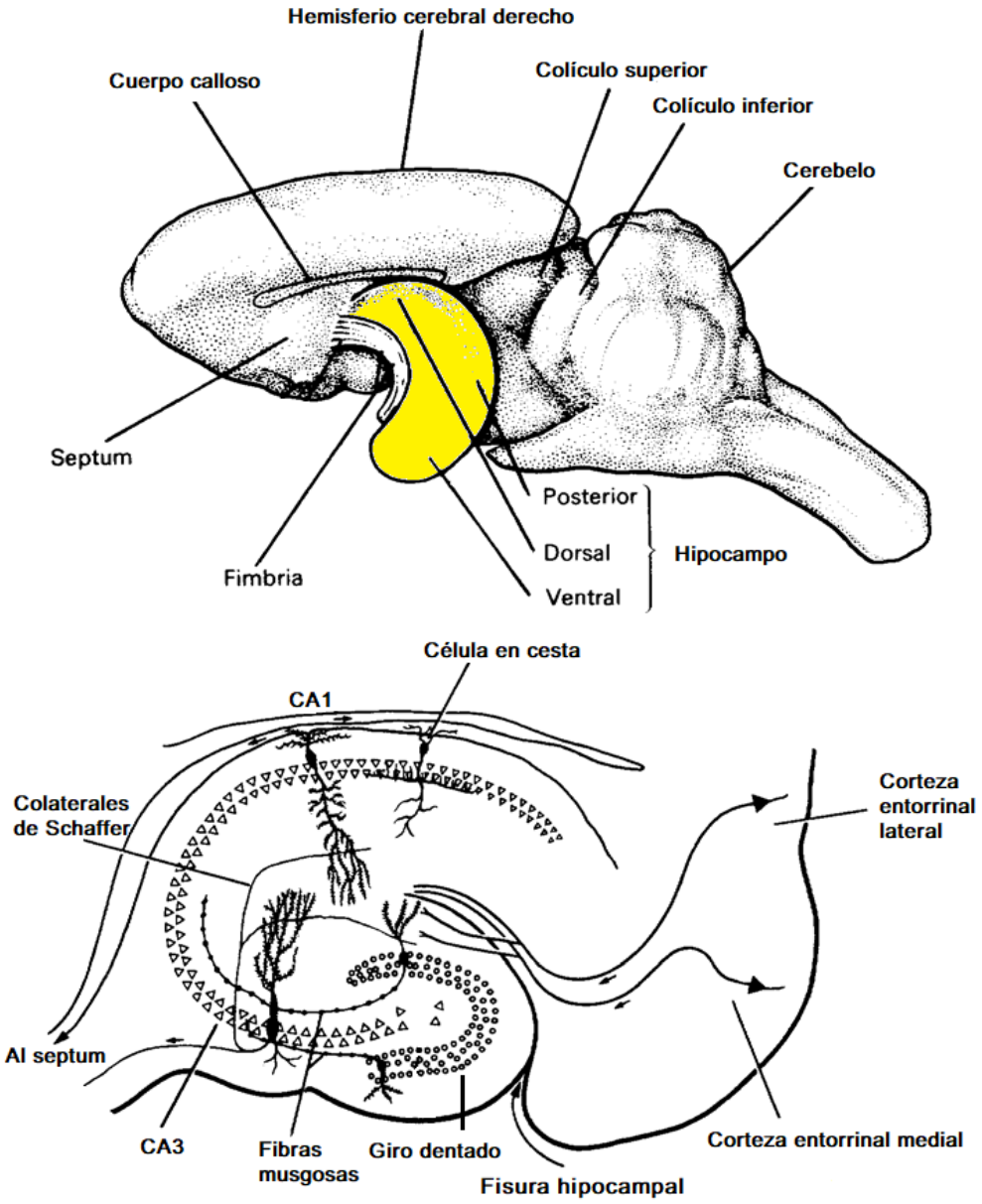


Figura 1: Representación del hipocampo de la rata
En el panel superior, se esquematiza el cerebro de la rata. La corteza temporal izquierda fue removida, lo que permite apreciar al hipocampo (en amarillo) en forma de "coma". En el panel inferior, se esquematizan las áreas principales, los tipos celulares y las conexiones intrahipocampales. (Adaptado de O'Keefe & Nadel, 1978).

1.3 Composición sináptica

Las sinapsis son estructuras especializadas que intermedian la comunicación entre neuronas. De forma simplificada, podemos mencionar tres elementos de toda sinapsis química: un terminal presináptico, un espacio sináptico y la célula posináptica. El terminal presináptico está cargado con vesículas que contienen los neurotransmisores, los cuales son sustancias que se unen a los receptores en la célula posináptica. La disponibilidad de las vesículas sinápticas para su liberación y su fusión con la membrana plasmática está altamente regulada. Existe una red de proteínas en el terminal presináptico que participan activamente en su regulación, como las SNAP-25, sinaptobrevina, sinaptotagmina y sinapsina, entre otros (Kandel et al., 2013d). El espacio sináptico separa al terminal pre de la célula posináptica y suele medir entre 20 y 40 nm (Kandel et al., 2013b). La estructura más destacable en la célula posináptica es una organela altamente organizada denominada densidad posináptica (PSD, por sus siglas en inglés; **Figura 2**). Es una estructura estable compuesta de múltiples proteínas como receptores de glutamato tipo NMDA y ácido α-amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA, por sus siglas en inglés), la enzima calcio calmodulina quinasa II (CaMKII) y la proteína Homer. Entre sus componentes más característicos se encuentran las proteínas de la familia MAGUK, particularmente la proteína de la densidad posináptica PSD95. Estas proteínas funcionan como estructura de andamiaje de la PSD (Kandel et al., 2013c).

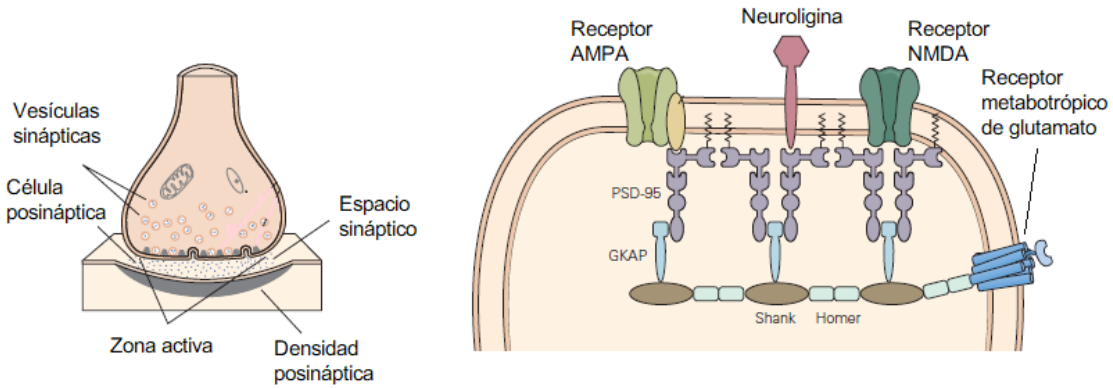


Figura 2: Estructura de la densidad posináptica en sinapsis excitatorias
A la izquierda, representación esquemática de una sinapsis excitatoria. Se observa el terminal presináptico cargado con vesículas sinápticas que contienen los neurotransmisores. Se observa también el espacio sináptico y la membrana de la célula posináptica. A la derecha, representación esquemática de la densidad posináptica (PSD) y de los receptores anclados a la membrana que interactúan con la PSD. (Adaptado de Kandel et al., 2013c).

La sinapsis está involucrada en los procesos de memoria y aprendizaje, como también en fenómenos de plasticidad como la potenciación de largo término. La

composición de la misma se ve alterada en los procesos mencionados. Se verá en mayor detalle en los **capítulos 3** y **4**.

1.4 Acetilación postraduccional de proteínas

Las modificaciones postraduccionales de proteínas son alteraciones reversibles que modulan las actividades e interacciones de las proteínas. Existen múltiples tipos de modificaciones postraduccionales siendo la fosforilación una de las más estudiadas. Otra de estas modificaciones, y la que estudiamos en este trabajo, es la acetilación (Shang et al., 2022). La misma consiste en la adición de un grupo acetilo a un residuo de lisina. Este proceso es mediado por las enzimas acetiltransferasas y deacetilasas (KATs y KDACs, por sus siglas en inglés). Mucha de la investigación de la acetilación postraduccional de proteínas fue enfocada en mecanismos epigenéticos, particularmente sobre la acetilación de histonas (Levenson et al., 2004; Lopez-Atalaya & Barco, 2014; Peixoto & Abel, 2013; Vecsey et al., 2007). En este trabajo nos enfocamos en el rol de la acetilación de proteínas no histonas, particularmente de localización sináptica, durante la consolidación de la memoria de evitación inhibitoria.

1.5 Objetivos

El objetivo general de este proyecto fue investigar la participación de la acetilación de proteínas sinápticas durante la consolidación de la memoria.

Los objetivos específicos fueron:

- Caracterizar el efecto facilitador de la Tubastatina A sobre la consolidación de la memoria de evitación inhibitoria.
- Estudiar el efecto de inhibidores de enzimas KATs sobre la consolidación de la memoria de evitación inhibitoria.
- Investigar los efectos de distintos inhibidores de KDACs sobre la acetilación de proteínas sinápticas del hipocampo de ratón, tanto *in vitro* como *in vivo.*
- Indagar acerca de la modulación de los niveles de acetilación de proteínas sinápticas y de la composición de la sinapsis durante la consolidación de la memoria de evitación inhibitoria.
- Inquirir sobre el efecto de la potenciación de largo término sobre los niveles de acetilación y la composición sináptica sobre cultivos primarios de neuronas de hipocampo de ratón.

1.6 Hipótesis

La actividad relacionada con la adquisición cambia los niveles de acetilación de proteínas sinápticas y altera la composición de la sinapsis. Estos cambios son necesarios y regulan el almacenamiento de la memoria a largo plazo.

Capítulo 2: Efecto de la inhibición de KDAC6 y KATs sobre la consolidación de la memoria de largo término

2.1 Introducción

2.1.1 KATs y KDACs

El estado de acetilación de una proteína está gobernado por el equilibrio en la actividad de dos grandes familias de enzimas: aquellas que adicionan grupos acetilo a los residuos de lisina y aquellas que los remueven. Las primeras son conocidas como acetiltransferasas de histonas (HAT, por sus siglas en inglés) y las segundas como deacetilasas de histonas (HDAC, por sus siglas en inglés). El nombre de tales enzimas responde a una cuestión histórica más que a delimitar su función: su actividad acetilasa o deacetilasa fue descubierta sobre proteínas histonas (Shang et al., 2022). Sin embargo, es de amplio conocimiento al día de hoy que no solamente actúan sobre histonas sino también sobre otras proteínas. Por tal motivo, y sumado a que ejercen su actividad sobre residuos de lisina (con símbolo químico “K”), nos pareció más apropiado adoptar la nomenclatura KAT (por sus siglas en inglés) para referirnos a las enzimas acetiltransferasas de lisinas y KDAC para las deacetilasas de lisinas. Actualmente, es habitual encontrar ambas referencias en la bibliografía científica.

Las KATs se clasifican en tres familias principales: GNAT (siglas del inglés acetil transferasa relacionada a la proteína de control general de síntesis de aminoácidos 5), MYST (acrónimo de los primeros cuatro miembros descubiertos) y p300/CBP (CBP, siglas del inglés proteína de unión a CREB). En la **Tabla 1** se presentan los miembros canónicos de cada familia (Narita et al., 2019). Existen otras enzimas no canónicas con actividad KAT, además de otra actividad enzimática previamente descripta, que no se listan en la tabla. Entre esas enzimas no canónicas se encuentra la NAT10, que regula positivamente la actividad de la enzima telomerasa mediante la estimulación de la transcripción y tiene un dominio acetiltransferasa (Q. Shen et al., 2009). Las enzimas KATs catalizan la transferencia de un grupo acetilo de forma dependiente de acetil-CoA, el cual actúa como donante. La acetilación también puede darse, aunque en menor frecuencia y menos estudiado, de forma no enzimática en presencia de acetil-CoA (Shang et al., 2022).

Familia	KAT	Otro nombre	Localización subcelular	Algunas proteínas blanco
GNAT	GCN5	KAT2A	Núcleo	H3, CEBPB

	PCAF	KAT2B	Núcleo	H3, H4, ACLY
	ELP3	KAT9	Núcleo/citoplasma	H3, H4, α-tubulina
	ATAT1		Citoplasma	α-tubulina
p300/CBP	CBP	KAT3A	Núcleo/citoplasma	H2A, H2B, H3, H4, NCOA, FOXO1
	p300	KAT3B	Núcleo/citoplasma	H3, FOXO1, KDAC1, SIRT2, ALX1
MYST	TIP60	KAT5	Núcleo/citoplasma	H2A, H4, FOXP3
	MOZ	KAT6A	Núcleo	H3, H4, p53, RUNX2
	MORF	KAT6B	Núcleo	H3, RUNX2
	HBO1	KAT7	Núcleo	H4
	MOF	KAT8	Núcleo	H4, p53

Tabla 1: Miembros canónicos de las familias de KATs de mamíferos
Modificado de Drazic et al., 2016.

Las KDACs fueron descubiertas 30 años después de las KATs, en 1995. Se clasifican en cuatro familias o clases, de I a IV. Los miembros de las clases I, II y IV son dependientes de Zn^{2+} para su actividad, mientras que las de la clase III dependen de NAD^{+} como cosustrato; estas últimas son conocidas como sirtuinas. Los miembros de la clase II se dividen a su vez en dos subclases, IIa y IIb; la IIa está conformada por KDAC4, 5, 7 y 9, de localización nuclear, mientras que la clase IIb está conformada por KDAC6 y 10, de localización principalmente citoplasmática (Drazic et al., 2016). En la **Tabla 2** se presentan los miembros canónicos de cada familia (Narita et al., 2019).

Clase	KDAC	Mecanismo catalítico	Localización subcelular	Algunas proteínas blanco
I	KDAC1	Dependiente de Zn^{2+}	Núcleo	H2A, H2B, H3, H4, RelA
	KDAC2		Núcleo	H2A, H2B, H3, H4, TSHZ3
	KDAC3		Núcleo	H2A, H2B, H3, H4, NF-κB, PCAF, STAT1, RelA
	KDAC8		Núcleo/citoplasma	H2A, H2B, H3, H4, p59, ERRα
IIa	KDAC4		Núcleo/citoplasma	H2A, H2B, H3, H4, HIF1α, p53
	KDAC5		Núcleo/citoplasma	GATA2, GCMa
	KDAC7		Núcleo/citoplasma	PLAG1

	KDAC9		Núcleo/citoplasma	ATDC
IIb	KDAC6		Principalmente citoplasma	Cortactina, α-tubulina, HSP90
	KDAC10		Principalmente citoplasma	HSP70, PP1
III	SIRT1	Dependiente de NAD^+	Núcleo	P53, FOXO1, HSF1, KAT7, CBP
	SIRT2		Citoplasma	α-tubulina
	SIRT3		Mitocondria	GDH, Ku70, MELP10
	SIRT4		Mitocondria	GLUD1
	SIRT5		Mitocondria	Citocromo c
	SIRT6		Núcleo	H3K56ac
	SIRT7		Núcleo	H3K18ac
IV	KDAC11	Dependiente de Zn^{2+}	Principalmente núcleo	H2A, H2B, H3, H4

Tabla 2: Miembros canónicos de las familias de KDACs de mamíferos
Modificado de Drazic et al., 2016.

2.1.2 KDAC6

De entre las enzimas deacetilasas, la KDAC6 (codificada por el gen *hdac6*) presenta dos particularidades interesantes. Por un lado, es la única KDAC con dos sitios de actividad deacetilasa; se plantea que cada sitio tendría diferentes proteínas blanco (Boyault et al., 2007; Perry et al., 2017). Por otro lado, tiene una localización principalmente citoplasmática, al igual que SIRT2 y KDAC10. En la **Figura 3** se representan sus dominios funcionales. La presencia de KDAC6 esta reportada en el hipocampo de ratón (Espallergues et al., 2012; Govindarajan et al., 2013) y a nivel subcelular se la ha reportado en la presinapsis (Perry et al., 2017 y resultados no publicados de nuestro laboratorio) y en dendritas (Southwood et al., 2007). Los primeros sustratos de deacetilación de KDAC6 identificados fueron HSP90, cortactina y α-tubulina (Hubbert et al., 2002; Kovacs et al., 2005; Matsuyama et al., 2002; X. Zhang et al., 2007; Y. Zhang et al., 2003). Reducir los niveles de KDAC6 en el hipocampo de ratón aumenta los niveles de acetil-α-tubulina (K40) sin cambiar la acetilación de histona 3 ni de histona 4 (H3 y H4, respectivamente) (Govindarajan et al., 2013). Se ha reportado que KDAC6 es capaz de deacetilar histonas *in vitro* pero no hay evidencias que lo haga *in vivo* (Butler et al., 2010; Sun et al., 2021). Mediante un protocolo de predicción de sustrato basado en estructura, se predijo que KDAC6 es una enzima promiscua que interactúa con varios sustratos; entre ellos la helicasa dependiente de ATP (DDX3X), la proteína asociada a

microtúbulos tau, β-catenina, NF-κB y la KAT p300. Estos datos sugieren que KDAC6 está involucrada en varias vías moleculares y que tiene una regulación compleja, ya que p300 es capaz de acetilar a KDAC6 y reducir su actividad deacetilasa de tubulina (Varga et al., 2021).

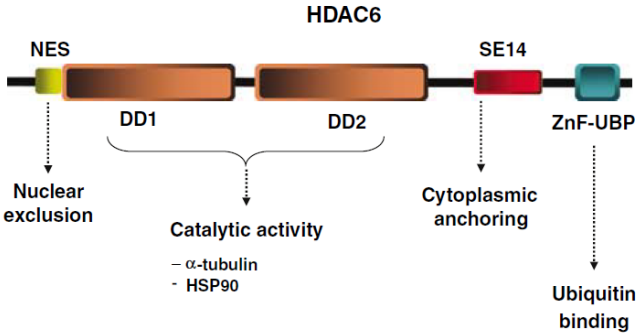


Figura 3: Organización de los dominios funcionales de KDAC6
KDAC6 es la única KDAC con dos sitios de actividad deacetilasa (DD1 y DD2). A su vez, posee una señal de exportación nuclear (NES), activa tanto en humanos como en roedores. El dominio SE14, presente en KDAC6 humana, ancla la enzima en el citoplasma. El dominio ZnF-UBP es un motivo de unión a ubiquitina. (Tomado de Boyault et al., 2007).

2.1.3 Inhibidores de KATs y KDACs

En los últimos 20 años se han desarrollado múltiples inhibidores de KATs y KDACs en busca de efectos antitumorales, antivirales y antiinflamatorios, entre otros. Algunos de estos inhibidores, especialmente inhibidores de KDACs, han mostrado mejorar síntomas en modelos de enfermedad de Alzheimer, Parkinson, Huntington y depresión y mejoras en la memoria y el aprendizaje (Ahmad Ganai et al., 2016; Jochems et al., 2014).

Uno de los inhibidores de KDACs más ampliamente evaluado en el estudio de la memoria es el butirato de sodio (NaB). Este compuesto es un ácido graso de cadena corta sintetizado por la fermentación bacteriana de la fibra dietaria en el intestino (Davie, 2003). Es un inhibidor de las KDACs de clases I y IIa que ha mostrado mejorar la memoria y el aprendizaje, aliviar déficits cognitivos y restaurar la densidad de espinas dendríticas en neuronas del hipocampo (Ahmad Ganai et al., 2016). Otro inhibidor ampliamente utilizado es la Tricostatina A (TSA), un ácido hidroxámico que inhibe a las KDACs de clases I y II y ha mostrado efectos facilitadores de la memoria y de retraso de progresión en modelos de neurodegeneración (Ahmad Ganai et al., 2016; Fontán-Lozano et al., 2008; Vecsey et al., 2007).

La Tubastatina A también es un derivado del ácido hidroxámico que inhibe potente y selectivamente a KDAC6 (IC50 = 0,015 μM), con una actividad 57 veces menor sobre KDAC8 (IC50 = 0,0854 μM) (Butler et al., 2010; S. Shen et al., 2020).

Recientemente se realizó una caracterización estructural y de actividad *in vivo* de KDAC6 y se encontró, en primer lugar, que inhibe potentemente a KDAC6, con un IC50 de 4,4 nM en un ensayo en células N2a (versus un IC50 contra KDAC1= 8100 nM). En segundo lugar, tras una inyección intraperitoneal de 10 mg/kg de peso corporal en ratones CD1, se encontró una concentración de TubA en plasma 26 veces más alta que su IC50; este valor cayó por debajo del IC50 a la hora y tras dos horas solo se hallaron trazas, lo que da cuenta de una vida media corta de la droga. Sin embargo, los niveles de α-tubulina acetilada fueron mayores que en los animales control a una y hasta cuatro horas luego de la administración de TubA. Esto indica que la exposición inicial a la droga afecta significativamente a la acetilación de α-tubulina. Adicionalmente, se reportaron efectos ansiolíticos, antidepresivos, antipsicóticos y cognitivos tan solo 15 minutos luego de una inyección intraperitoneal de 60 mg de TubA por kg de peso corporal en ratones (S. Shen et al., 2020).

Entre los inhibidores de KATs hay una amplia variedad de drogas que actúan sobre la enzima p300. Entre ellos se encuentran el garcinol, el ácido anacárdico, la curcumina y el Inhibidor de HAT-2 (Hi2, por sus siglas en inglés). Este último compuesto mostró una potente inhibición de p300 *in vitro*, con un IC50 de 5μM y la capacidad de penetrar en células HeLa y reducir la acetilación de H3 (Costi et al., 2007). La Remodelina, por otro lado, se comercializa como un inhibidor de la KAT NAT10. Se descubrió inicialmente como un inhibidor de la KAT de levaduras Gcn5p, con actividad inhibitoria evidenciada por la reducción de la acetilación de histonas tanto *in vitro* como *in vivo* (Chimenti et al., 2009). La Remodelina mostró efectos positivos en un modelo celular de laminopatía y la capacidad de inhibir la acetilación de tubulina mediada por NAT10 *in vitro* (Larrieu et al., 2014).

2.1.4 Acetilación y memoria

La acetilación de proteínas juega un papel importante en el desarrollo del sistema nervioso, afecta la conducta y está relacionada al establecimiento o progresión de desórdenes psiquiátricos y enfermedades neurodegenerativas (Penney & Tsai, 2014). Se ha estudiado ampliamente en procesos de memoria y aprendizaje como también en fenómenos de plasticidad sináptica (LoPresti, 2020). Una estrategia utilizada para investigar el rol de la acetilación en la formación de memorias ha sido el uso de inhibidores de KDACs. Se ha demostrado que la inhibición de KDACs de clase I y IIa (principalmente nucleares) mediante la administración intrahipocampal de butirato de sodio (NaB) en ratones facilita la consolidación de la memoria de largo término y la persistencia de la memoria de reconocimiento de objeto novedoso (NOR, por sus siglas en inglés). A su vez, el NaB causó un aumento de la acetilación de la histona 3 una hora

luego del entrenamiento (Federman et al., 2013). Un resultado similar se observó utilizando el laberinto acuático de Morris (MWM, por sus siglas en ingles), mediante un entrenamiento masivo, el cual no genera memoria de largo término, tras el cual se administró NaB o vehículo de forma intrahipocampal; los animales inyectados con NaB mostraron facilitación de la memoria. Se midieron los niveles de histona 3 e histona 4 acetiladas 30, 60 y 120 minutos luego del entrenamiento de MWM e inyección de NaB o vehículo; los animales que recibieron NaB mostraron niveles significativamente mayores de acetilación a 30 minutos para histona 3 y a 30 y 60 minutos para histona 4 (Villain et al., 2016). Los autores de este trabajo concluyeron que la administración de NaB durante la consolidación de la memoria promueve un mayor estado de acetilación de histonas involucradas en la expresión de genes relacionados a la formación de memorias, lo que facilita su consolidación aún en protocolos de aprendizajes que normalmente no generan memoria de largo término.

La tricostatina A (TSA) es un inhibidor inespecífico de KDACs de clase I y II (KDAC6 incluida) y se ha demostrado que tiene un efecto facilitador de la memoria. En el mismo trabajo de Federman y su equipo mencionado en el párrafo anterior reportaron un efecto facilitador sobre la memoria de largo término de la tarea de NOR. Resultados semejantes se reportaron para la tarea de reconocimiento de ubicación novedosa (NOL, por sus siglas en inglés) en ratones (Hawk et al., 2011). El mismo efecto se observó sobre la memoria de largo término en la tarea de MWM en ratones jóvenes. Una hora después del entrenamiento los animales exhibieron un aumento en los niveles de histona 4 acetilada en la región CA1 del hipocampo dorsal y en la parte dorsomedial del estriado. Paradójicamente, la TSA produjo una disminución en la acetilación de histonas en la región CA1 del hipocampo ventral y en la amígdala lateral. En ratones envejecidos no se observaron mejoras en la memoria tras la administración de TSA ni un rescate de los menores niveles de histona 4 acetilada asociada a la edad en la región dorsomedial del estriado, pero si en la región CA1 del hipocampo dorsal. Contrariamente a los ratones jóvenes, la TSA produjo un incremento de la acetilación de histonas en la región CA1 del hipocampo ventral y en la amígdala lateral (Dagnas et al., 2015).

Son escasos los reportes sobre el rol de KDAC6 en la formación de memorias en modelos fisiológicos, es decir en animales que no modelan alguna patología. En larvas de *Drosophila melanogaster,* KDAC6 es necesaria para la retención de memoria; específicamente, el dominio DD1 es requerido (Perry et al., 2017). También en moscas, en un modelo de toxicidad inducida por beta amiloides, se observó un efecto diferente para la expresión de KDAC6 con uno u otro sitio deacetilasa incrementado. Cuando se expresaba una forma de KDAC6 con el sitio DD1 incrementado, se rescataba el déficit

de memoria inducido por los beta amiloides sin afectar la longevidad de los animales. Por el contrario, la expresión de KDAC6 con el sitio DD2 incrementado promovía la fosforilación de la proteína tau y reducía la esperanza de vida de las moscas sin afectar su performance cognitivo (Cheng et al., 2022). En un modelo murino de taupatía, la inhibición crónica de KDAC6 con Tubastatina A revirtió el déficit de memoria y el fenotipo hiperactivo así como también redujo los niveles totales de tau (Selenica et al., 2014).

En un trabajo previo de nuestro grupo se evaluó el efecto de la Tubastatina A sobre la consolidación de largo término de la tarea de evitación inhibitoria en ratones. La Tubastatina A, inyectada de forma intraperitoneal inmediatamente después del entrenamiento, facilitó la retención de la memoria, evaluada 48 horas después de la adquisición (Esquivel, 2017).

2.1.5 La tarea de evitación inhibitoria

La tarea de evitación inhibitoria (EI) ha sido ampliamente utilizada para el estudio de procesos de memoria, como ser consolidación, reconsolidación y extinción (Blake et al., 2004; M. Boccia et al., 2007; M. M. Boccia et al., 2004; M. M. Boccia & Baratti, 2000; Cammarota et al., 2004; Fanselow, Michael S., 1990; Freudenthal et al., 2005; Izquierdo et al., 2006; Rosa et al., 2023). Es una tarea de tipo asociativa, contextual y aversiva; cuando se realiza sin shock eléctrico puede dar origen a una memoria apetitiva de alivio (Salles et al., 2017). Un solo ensayo, es decir una única exposición a los estímulos, es suficiente para promover la formación de una memoria de largo término. La evitación inhibitoria de un ensayo puede adoptar dos modalidades generales, *step-down*, donde el roedor es colocado sobre una plataforma elevada de la que puede bajar a una superficie desde donde se le administra el estímulo aversivo, o *step-through*, donde los animales atraviesan una puerta o umbral para pasar de la plataforma a la superficie que administra el shock eléctrico. En este último caso, el compartimiento donde se administra el shock eléctrico es oscuro, con lo que, inicialmente, los animales son motivados hacia el cuarto oscuro por fototaxia negativa y tigmotaxia propias de los roedores. Tanto durante el condicionamiento como en la/s evaluación/es, se registra el tiempo que los animales permanecen en la plataforma. En la evaluación, una mayor latencia para entrar al compartimiento oscuro en animales entrenados que en animales control se toma como medida de retención de la memoria. Este paradigma, en su modalidad de un ensayo, es especialmente útil en abordajes bioquímicos o farmacológicos del estudio de la memoria ya que permite saber con precisión el momento donde se produce el condicionamiento (Izquierdo et al., 2006).

Motivados por los resultados previos del laboratorio mencionados en la sección 2.1.4, nos propusimos caracterizar la especificidad de la acción del inhibidor de KDAC6, la Tubastatina A, sobre la consolidación de la memoria de largo término utilizando la tarea de evitación inhibitoria de un ensayo, en su modalidad *step-through* y aversivo. También probamos el efecto de dos inhibidores de KATs sobre la consolidación de la memoria, el Inhibidor de HAT-2 (Hi2) y la Remodelina (Re). El primero es un inhibidor de p300 y el segundo, de NAT10 (Chimenti et al., 2009; Costi et al., 2007).

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Animales

Se utilizaron ratones macho CF-1 (Fundacal, Buenos Aires, Argentina) de 60-70 días de edad y 25-30 g de peso corporal. Fueron alojados en grupos de 4 a 5 animales y permanecieron alojados de esa manera durante los procedimientos experimentales. Los ratones se mantuvieron en una habitación mantenida entre 21 y 23°C en un ciclo de luz y oscuridad de 12 h (las luces se encienden a las 6:00 a. m.) con acceso *ad libitum* a alimento seco y agua del grifo. Los experimentos se realizaron de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del *National Institute of Health* de Estados Unidos (publicación NIH nº 80-23/96) y con la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (Protocolo experimental nº 173). Se hicieron todos los esfuerzos posibles para minimizar el sufrimiento de los animales y reducir el número de animales utilizados.

2.2.2 Cirugía

Para los experimentos de inyecciones intrahipocampales, se prepararon a los ratones 48 horas antes del entrenamiento. Las inyecciones se administraron bajo anestesia ligera con éter en un instrumento estereotáxico (Protocolo experimental REDEC-2022-2371-E-UBA-DCT_FFYB). La cirugía preliminar también se realizó bajo anestesia con éter y consistió en remover el cuero cabelludo y perforar dos agujeros simétricos a través del cráneo sin perforar el cerebro. Se cubrió el cráneo con cera para huesos y luego se devolvió al ratón a su jaula. La solución de vehículo o fármaco se infundió bilateralmente en las siguientes coordenadas estereotáxicas: A/P (-1,5 mm posterior al bregma), D/I (+1,5 mm desde la sutura sagital media) y V (-1,5 mm desde una superficie plana del cráneo) (Paxinos & Franklin, 2019). Las inyecciones se realizaron durante 90 segundos a través de una aguja roma de acero inoxidable de calibre 30 unida a una jeringa Hamilton de 5 µl con tubo de PE-10 y accionada manualmente.

Para la inyección intrahipocampal de Remodelina y posterior extracción de proteínas del hipocampo, los animales fueron implantados con cánulas calibre 23 la semana previa al experimento, en un instrumento estereotáxico bajo anestesia profunda (130 mg/kg de ketamina y 10 mg/kg de xilacina). Se removió el cuero cabelludo y se perforaron dos agujeros simétricos a través del cráneo, sin perforar el cerebro, en las siguientes coordenadas estereotáxicas: A/P (-1,5 mm posterior al bregma) y D/I (+1,5 mm desde la sutura sagital media) (Paxinos & Franklin, 2019). Se bajaron las cánulas (-1,5 mm desde una superficie plana del cráneo) y se las fijaron al cráneo con acrílico dental conteniendo hidróxido de calcio y luego se devolvió al ratón a su jaula. La solución de vehículo o fármaco se infundió bilateralmente. Las inyecciones se realizaron durante 90 segundos a través de una aguja roma de acero inoxidable de calibre 30 unida a una jeringa Hamilton de 5 µl con tubo de PE-10 y accionada manualmente.

Se evaluó la precisión de las inyecciones intrahipocampales con una lupa estereoscópica, sólo se incluyeron en el análisis los datos de animales con inyecciones que alcanzaron las áreas previstas.

2.2.3 Drogas

En los experimentos de inyecciones sistémicas, los ratones recibieron inyecciones intraperitoneales (IP) de Tubastatina A (TubA; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI; 40 mg/kg) disuelta en vehículo (veh; DMSO 15 %, PEG 10 %, TWEEN-20 2 % y solución salina), o un volumen equivalente de solución vehículo. El volumen inyectado fue de 300 µl.

Para el experimento de administración intrahipocampal de TubA, los ratones recibieron infusiones bilaterales de Tubastatina A 80 µM disuelta en DMSO al 50 % en solución salina, o un volumen equivalente de DMSO al 50 % en solución salina (vehículo). El volumen de inyección fue de 1 µl.

Para el experimento de administración intrahipocampal de inhibidores de KATs, los ratones recibieron infusiones bilaterales del Inhibidor de HAT-2 4,8 µg/µl (Hi2; Cayman Chemical) o de Remodelina 8 µg/µl (Re; Cayman Chemical) disueltos en DMSO o un volumen equivalente de DMSO (vehículo). El volumen de inyección fue de 0,5 µl.

2.2.4 Evitación inhibitoria

El comportamiento de evitación inhibitoria se estudió en una situación de aprendizaje de tipo *step-through* de un solo ensayo (M. M. Boccia et al., 2004), que aprovecha la preferencia natural de los ratones por un ambiente oscuro. El aparato

consta de un compartimento oscuro (20 x 20 x 15 cm) con un suelo de rejilla de acero inoxidable y una plataforma elevada iluminada (5 x 5 cm). Los ratones no tenían experiencia en el compartimento oscuro antes de la prueba de aprendizaje. Durante el entrenamiento, cada ratón fue colocado en la plataforma y recibió un shock eléctrico en las patas cuando entró en el compartimento oscuro. Los animales fueron entrenados con una de dos intensidades del shock eléctrico: un shock débil (grupo SD; 0,4 mA, 50 Hz, 1 s) que muestra latencias de entrada medianas de 150 s en la evaluación, y un shock fuerte (grupo SF; 0,8 mA, 50 Hz, 1 s) que muestra latencias de entrada medianas en el techo (300 s). Para algunos experimentos se utilizó un grupo control donde el experimentador introdujo al ratón en el compartimiento oscuro e inmediatamente recibió una descarga fuerte en las patas (grupo IS; 0,8 mA, 50 Hz, 1 s), después de lo cual se lo devolvió a su jaula. Estos animales no forman una memoria de largo término asociativa entre el contexto y el estímulo aversivo (Fanselow, Michael S., 1990). Las latencias de entrada medianas en la evaluación para este último grupo son de alrededor de 15 s.

En los tiempos indicados para cada experimento (2 y/u 8 días) se realizó la evaluación de la memoria. En la misma, cada ratón se volvió a colocar en la plataforma y se registró la latencia de entrada. La evaluación finalizó cuando el ratón entró en el compartimento oscuro o no logró cruzar en 300 s. En el último caso, el ratón se retiró inmediatamente de la plataforma y se le asignó una puntuación de 300 s. En la evaluación se omitió el shock eléctrico.

2.2.5 Extracto de proteínas hipocampales

Las proteínas se obtuvieron en extractos seriados de cada hipocampo de ratón mediante centrifugación diferencial de la siguiente manera: se mataron los ratones, se extrajeron los cerebros y se diseccionaron los hipocampos (Glowinski & Iversen, 1966). Cada hipocampo de ratón se homogeneizó en 250 µl de buffer 1 (Tris-HCl 20 mM, sacarosa 320 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4) con quince golpes en un homogeneizador Dounce, mortero tipo B. Se tomó una alícuota de 20 µl del homogeneizado resultante y se agregaron 10 µl de dodecilsulfato de litio (LDS, por sus siglas en inglés) al 15 % y 10 µl de buffer de carga (Tris al 3 % p/v, dodecilsulfato de sodio al 4 % p/v, glicerol al 40 % p/v). v) (**extracto homogenato total, HT**). El homogenato total fue incubado por 5 minutos a 95ºC y luego conservado a -80°C hasta su uso. El homogeneizado restante se centrifugó durante 15 minutos a 1000 g. El sobrenadante (S1) se separó en un tubo nuevo y el sedimento (P1) se resuspendió en 250 µl de buffer 1 y se centrifugó durante 10 minutos a 1000 g. El nuevo sobrenadante (S2) se mezcló con el anterior (S1+S2) y el sedimento (P2) se conservó para el extracto nuclear. El sobrenadante (S1+S2) se

centrifugó durante 30 minutos a 13000 g, luego se descartó el sobrenadante y al sedimento se añadieron cuatro volúmenes de un buffer hipotónico (Tris-HCl 5 mM, CaCl2 50 µM, pH 8,1), se resuspendió vigorosamente y se centrifugó durante 50 minutos a 15800 g. Nuevamente, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en un buffer hipotónico con detergente Tritón al 1 % y se centrifugó durante 50 minutos a 15800 g. Una vez más, el sobrenadante se descartó y el sedimento se resuspendió en un buffer hipotónico con LDS al 1 % (**extracto enriquecido en densidades posinápticas, eDPS**) y se mantuvo a -80°C hasta su uso. El sedimento P2 fue resuspendido en 250 µl de buffer A (Heppes 10 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM, KCl 10 mM, ditiotreitol 1 mM, pH 7,9) y 20 µl de H_2SO_4 0,4 N e incubado por 30 minutos a 4ºC. Luego se centrifugó por 10 minutos a 14000 g y se transfirió 200 µl del sobrenadante a 1200 µl de acetona y se incubó 12 horas a -20°C. Finalmente, se centrifugó por 30 minutos a 14000 g, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en buffer de carga 1X, sin azul de bromofenol (**extracto de histonas**). Todo el ensayo se realizó a 4°C. Los buffers de extracción contenían los siguientes inhibidores: de proteasas, aprotinina 0,8 µM; pepstatina A 1,5 µM; fluoruro de fenilmetansulfonilo (PMSF) 0,5 mM; leupeptina 23 µM; de fosfatasas y quinasas: ortovanadato 0,2 mM; de deacetilasas: tricostatina A 3,3 µM.

2.2.6 Western blot

El contenido de proteínas de los extractos se midió por duplicado con el kit de reactivos de ensayo de proteínas BCA (Thermo Scientific, Waltham, MA, EEUU). Para los ensayos de Western Blot, se añadió buffer de carga a las muestras que luego se incubaron a 95°C durante 5 minutos y se colocaron inmediatamente en hielo. Se procesaron cantidades iguales de proteína para cada muestra mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) con 10% de acrilamida en el gel de resolución. Luego, las proteínas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) para la inmunotransferencia. La inmunomarcación se realizó con anticuerpos anti-lisina acetilada (AcLys; Cell Signaling Technology, CST-9441S, dilución 1:1000) y anti-α-tubulina acetilada (Santa Cruz, SCBT-23950, dilución 1:8000), siguiendo los protocolos de los fabricantes. Con los extractos nucleares se utilizaron los anticuerpos anti-histona 3 (H3; Saint John´s Laboratory, STJ96940, dilución 1:2000) y anti-histona 3 acetilada en la lisina 9 (H3-Ac-K9; Saint John´s Laboratory, STJ90121, dilución 1:2000). La detección del anticuerpo secundario unido a HRP anti-ratón (Cell Signaling, CST-7076, dilución 1:10000) o anti-conejo (Santa Cruz, SCBT-2030, dilución 1:5000) se realizó con el kit Advance ECL (GE Healthcare, Amersham, BM, Reino Unido) como lo describe el fabricante y las señales se capturaron

usando Amersham Imager 600 (GE Healthcare, Amersham, BM, Reino Unido). La densidad óptica (OD) se estimó utilizando el software ImageJ 1.53c.

2.2.7 Análisis estadístico

Los datos de comportamiento fueron analizados empleando modelos lineales generalizados y lineales generalizados mixtos (GLM y GLMM respectivamente, por sus siglas en inglés). En todos los casos, a menos que se indique lo contrario, la variable respuesta fue la latencia de entrada al compartimiento oscuro y la variable explicativa de efectos fijos, el tratamiento/grupo asignado.

El análisis de los datos para el SD-veh en el entrenamiento versus la evaluación (presentados en la **Figura 4**) fue realizado siguiendo un GLMM, con distribución Gamma y función de enlace logarítmica. En este caso la única variable explicativa de efectos fijos considerada fue el tiempo (factor con dos niveles: entrenamiento, evaluación); se consideró la identidad de cada ratón como una variable de efectos aleatorios para declarar la falta de independencia entre los datos de un mismo animal. Para la comparación entre SI-veh y SD-veh en la sesión de evaluación, se modeló un GLM con distribución Gamma y función de enlace logarítmica.

El análisis de los datos para la ventana de acción de la TubA (presentados en la **Figura 5**) fue realizado siguiendo un GLM, con distribución Gamma y función de enlace logarítmica; se realizó un modelo para los datos del entrenamiento y uno para los datos de la evaluación.

Para los análisis de los datos de administración intrahipocampal de TubA e inhibidores de KATs (**Figura 6** y **Figura 7**, respectivamente) se emplearon GLM para los entrenamientos (Gamma, función logarítmica) y GLMM para las evaluaciones (Lognormal, función de logarítmica). Como variables respuesta de efectos fijos se consideraron los tratamientos (factor con cuatro niveles) y el tiempo (factor con dos niveles: E1, E2) y la interacción entre ambos. Se consideró la identidad de cada ratón como una variable de efectos aleatorios para declarar la falta de independencia entre los datos de un mismo animal.

Los datos moleculares (**Figura 8**) fueron analizados usando modelos lineales. Dado que el experimento se realizó en dos días distintos, inicialmente se ajustaron modelos lineales mixtos para todas las variables respuesta, con los días de experimento como variable de efectos aleatorios. Luego se evaluó el término aleatorio del modelo con el comando `'ranova()'` del paquete lmerTest (Kuznetsova et al., 2017). Como la prueba del componente aleatorio no fue significativa para las variables estudiadas,

entonces se utilizaron modelos sin término aleatorio (parsimonia). Para la prueba de hipótesis de diferencias entre grupos se realizó la prueba t de Student del paquete stats.

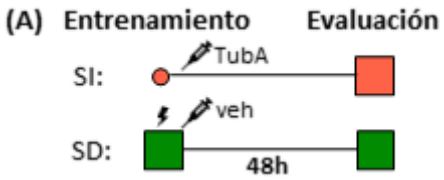
El análisis estadístico y las figuras fueron generados usando los softwares R y Rstudio (Posit team, 2023; R Core Team, 2023). Se emplearon los paquetes stats y glmmTMB para el modelado y Dharma para corroborar los supuestos de los modelos (Brooks et al., 2017; Harting, 2022). Para la prueba de hipótesis de diferencias entre grupos se utilizó el comando `'Anova()'` del paquete car y las comparaciones múltiples se realizaron con la prueba de Tukey sobre las medias marginales estimadas (MME) de los grupos en cada modelo utilizando el paquete emmeans (Lenth, 2023). Los gráficos se realizaron empleando los paquetes ggplot2, gggsignif y patchwork (Ahlmann-Eltze & Patil, 2021; Pedersen, 2024; Wickham, 2016).

2.3 Resultados

Estudiamos la especificidad del efecto de la inhibición de KDAC6 sobre la consolidación de la memoria de EI en tres aspectos: su especificidad de acción sobre el proceso de consolidación (poniendo a prueba su efecto sobre la latencia en animales expuestos al contexto y refuerzo pero que no generan memoria), de acción temporal (definiendo una ventana temporal de acción) y neuroanatómica (administrando TubA solo en un área del cerebro que es necesaria para esta tarea).

2.3.1 Especificidad del efecto de la inhibición de KDAC6

Para evaluar si el efecto observado de la TubA sobre la conducta de los animales es específico sobre la consolidación de una memoria, entrenamos dos grupos de ratones en la tarea de EI: un grupo entrenado con un shock débil e inyectado intraperitoneal con vehículo inmediatamente después del entrenamiento (SD-veh) y un grupo shock inmediato inyectado con TubA en las mismas condiciones (SI-TubA) (**Figura 4**).



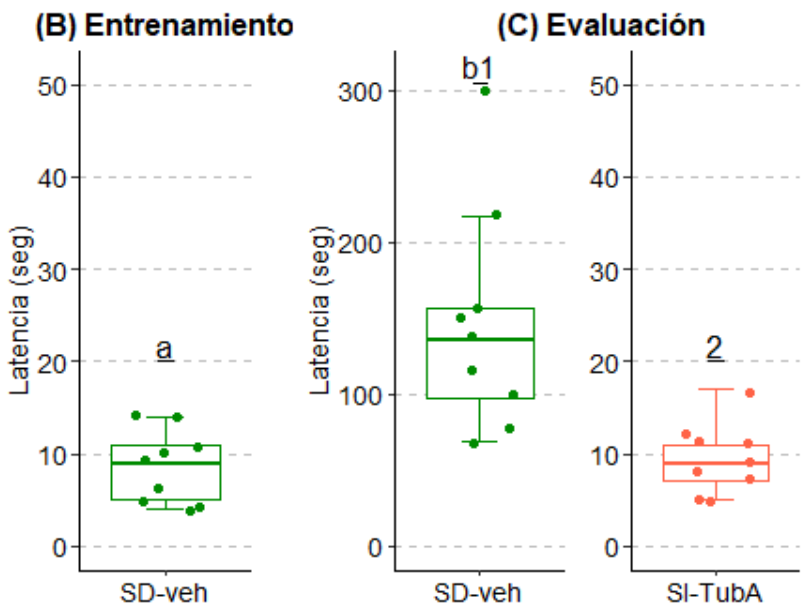


Figura 4: La Tubastatina A no altera la conducta de animales que no están consolidando una memoria
(A) Procedimiento experimental. **(B)** Latencias de entrada del grupo SD-veh durante el entrenamiento. **(C)** Latencias de entrada durante la evaluación; los grupos se muestran separados a fin de ajustar la escala. Las diferencias estadísticamente significativas entre las latencias del entrenamiento y la evaluación del grupo SD-veh se indican mediante diferentes letras (prueba de Wald). Las diferencias estadísticamente significativas entre las latencias de los grupos en la evaluación se indican con números distintos (prueba de razón de verosimilitud). n = 9 por grupo.

En primer lugar, se observa en el grupo SD-veh una latencia mediana (Q1; Q3) de 9 s (5; 11) en la sesión de entrenamiento y de 136 s (98; 157) en la sesión de evaluación; la prueba de Wald sobre el modelo lineal generalizado mixto arrojó un aumento estadísticamente significativo (Prueba de Wald: $\chi^2_{(1)} = 178{,}88$; $p < 0{,}0001$), con una media marginal estimada (MME) en la evaluación 17 veces mayor que en el entrenamiento (MME del entrenamiento: 8,56 s; MME de la evaluación: 146,44 s). Esto indica que animales sometidos a la tarea de EI condicionados con un shock débil cambian su comportamiento frente a una segunda exposición al contexto condicionado, es decir que muestran retención de la memoria de largo término. En segundo lugar, el grupo SI-TubA muestra una latencia mediana de 9 s (7; 11 s), cuya diferencia con el grupo SD-veh en la sesión de evaluación es estadísticamente significativa (Prueba de razón de verosimilitud: $\chi^2_{(1)} = 128{,}93$; $p < 0{,}0001$). La MME del grupo SD-veh fue 15 veces mayor que la del grupo SI-TubA (MME de SI-TubA: 9,44 s). En este caso observamos que el grupo SI-TubA, que recibió el estímulo aversivo pero no fue condicionado al contexto, muestra una latencia significativamente menor que el grupo que muestra retención de la memoria (SD-veh) y que, a su vez, la mediana de retención del grupo SI-TubA es similar a la del grupo SD-veh previo al condicionamiento (**Figura**

5-B). La latencia observada en el grupo SI-TubA es la esperada para animales que recibieron ese tratamiento (SI) pero no fueron inyectados (Esquivel, 2017), o incluso para animales inyectados con vehículo en el hipocampo (ver **Figura 6**). Esto indica que ni las inyecciones per se, ni las drogas administradas (veh o TubA) afectan las latencias de estos animales en la evaluación y que comportamentalmente son controles similares.

Para evaluar la especificidad temporal (ventana de efecto) de la TubA sobre la memoria, se entrenaron dos grupos de animales con un mismo refuerzo (SD) y se les administró la misma droga (TubA) pero en momentos diferentes: un grupo recibió la droga inmediatamente después del entrenamiento (0h) y el otro, 3 horas más tarde (3h; **Figura 5-A**).

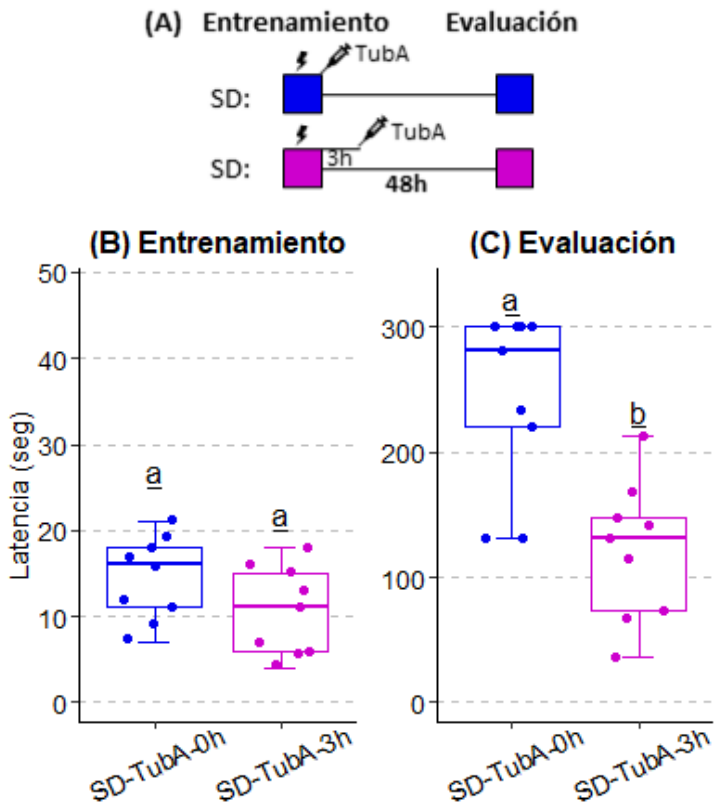


Figura 5: La Tubastatina A facilita la memoria de largo término cuando se administra inmediatamente después del entrenamiento, pero no 3 h después
(A) Procedimiento experimental. **(B)** Latencias de entrada durante el entrenamiento; las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos se indican mediante diferentes letras (prueba de razón de verosimilitud) **(C)** Latencias de entrada durante la evaluación. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos se indican mediante diferentes letras (prueba de razón de verosimilitud). n = 9 por grupo.

En el entrenamiento se registraron latencias medianas (Q1; Q3) de 16 (11; 18) y 11 s (6; 15) para los grupos SD-TubA-0h y SD-TubA-3h, respectivamente, sin diferencias estadísticas significativas (**Figura 5-B**; Prueba de razón de verosimilitud: $\chi^2_{(1)} = 2{,}415$; $p < 0{,}1202$). En la evaluación las latencias medianas (Q1; Q3) fueron

de 281 (221; 300) y 131 s (73; 147), una diferencia que fue estadísticamente significativa (**Figura 5-C**; Prueba de razón de verosimilitud: $\chi^2_{(1)} = 14{,}904$; $p = 0{,}0001$). La MME del grupo SD-TubA-0h fue más del doble de la del grupo SD-TubA-3h (MME, SD-TubA-0h: 244 s; SD-TubA-3h: 121 s). Concluimos de estos resultados que el efecto facilitador de la TubA tiene una ventana acción que se cierra antes de las 3 horas posteriores al entrenamiento, indicando un efecto durante la ventana de consolidación de esta memoria.

Para evaluar la especificidad de acción anatómica de la TubA, se entrenaron animales en la tarea de EI e inmediatamente después fueron inyectados con vehículo o Tubastatina A en el hipocampo; los grupos fueron: SD-veh, SD-TubA, SF-veh y un grupo control SI-veh (**Figura 6-A, B**).

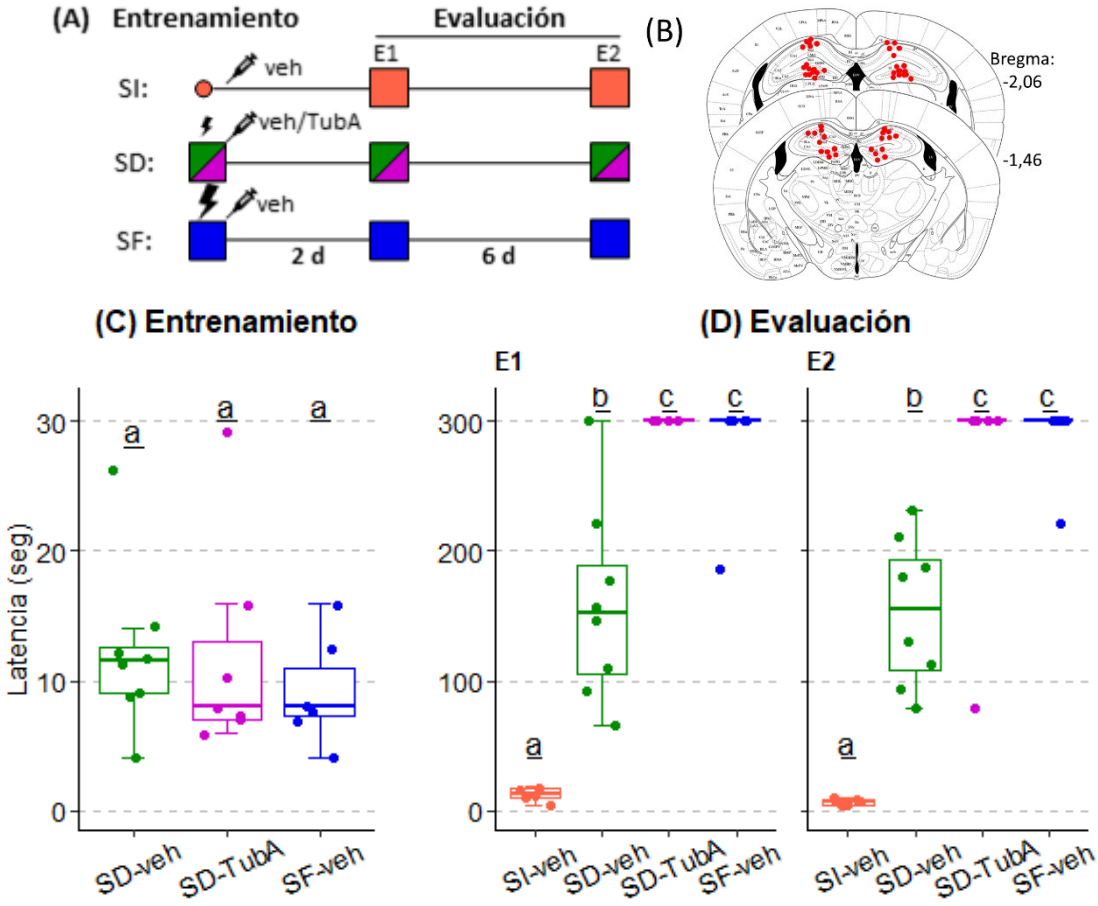


Figura 6: La administración intrahipocampal de Tubastatina A es suficiente para facilitar la consolidación de la memoria de EI

(A) Procedimiento experimental. **(B)** Sitios de las inyecciones. **(C)** Latencias de entrada de los grupos durante el entrenamiento y **(D)** durante la evaluación a 2 (E1) y 8 días (E2). Las letras distintas indican diferencias estadísticas significativas entre los grupos mediante prueba de Tukey (las comparaciones son intrasesión). n= SI-veh: 6, SD-veh: 8, SF-veh: 6 y SD-TubA: 7.

Las medianas (Q1; Q3) de las latencias durante el entrenamiento fueron 11,5 (9; 12,5), 8 (7; 13) y 8 s (7,3; 11) para los grupos SD-veh, SD-TubA y SF-veh respectivamente; no se observaron diferencias estadísticas significativas (**Figura 6-C**; Prueba de razón de verosimilitud: $\chi^2_{(2)}$ =0,916; p = 0,6326). En la primera sesión de evaluación (E1), el grupo SI-veh registró una latencia mediana de 13,5 s (10,25; 16,75), mientras que para el grupo SD-veh fue de 151,5 s (105,8; 188,8) y de 300 s (300; 300) para los grupos SD-TubA y SF-veh. En la segunda sesión de evaluación (E2), se observaron medianas similares a E1, a saber: 7 (4,8; 8,5), 154,5 (107,5; 193,8), 300 (300; 300) y 300 (300; 300) para los tratamientos SI-veh, SD-veh, SD-TubA y SF-veh, respectivamente. La prueba de Wald sobre el modelo lineal generalizado mixto de los datos de las evaluaciones fue significativa para la variable tratamiento (**Figura 6-D**; $\chi^2_{(3)}$ = 145,165; p < 0,0001) mas no así para la variable tiempo de evaluación ($\chi^2_{(1)}$ = 0,348, p = 0,5551) ni para la interacción entre ambas variables ($\chi^2_{(3)}$ = 1,339; p = 0,7199). Esto indica que la variable tratamiento explica las variaciones observadas entre grupos y que los mismos no variaron entre las dos evaluaciones. La MME del grupo SI-veh fue de 28,9 s en E1, significativamente menor que la de los demás grupos (SD-veh: 152,3 s; SD-TubA: 288,9 s; SF-veh: 280 s). La prueba de Tukey entre el grupo SI-veh y cada uno de los tres grupos restantes en E1 fue significativa (p < 0,0001 para cada una de las tres comparaciones). De igual manera, el tratamiento SD-veh mostró una MME significativamente menor que SD-TubA y SF-veh (p = 0,0002 y 0,0005, respectivamente). Los tratamientos SD-TubA y SF-veh no difirieron entre sí (p = 0,9956). En síntesis, animales que recibieron un estímulo débil (SD) y TubA intrahipocampal muestran latencias significativamente mayores que animales que también recibieron el estímulo débil pero vehículo, y similares a la de animales que recibieron un estímulo más fuerte (SF) y vehículo. En la segunda sesión de evaluación (E2) se registraron resultados similares: las MME fueron 21,7, 153,4, 259,1 y 285,8 s para los grupos SI-veh, SD-veh, SD-TubA y SF-veh, respectivamente. La prueba de Tukey indicó diferencias significativas entre SI-veh y los grupos SD-veh, SD-TubA, SF-veh (p < 0,0001 para cada una de las tres comparaciones); también entre SD-veh y SD-TubA, SF-veh (p = 0,0032 y 0,0002, respectivamente). Los tratamientos SD-TubA y SF-veh no difirieron entre sí (p = 0,8932).

Estos resultados prueban que la inhibición de KDAC6 en el hipocampo es suficiente para facilitar la memoria de EI y que la retención de la memoria facilitada persiste hasta al menos 8 días después del entrenamiento.

2.3.2 Efecto de la inhibición de KATs

Para estudiar el efecto de la inhibición de KATs sobre la memoria de largo término empleamos dos compuestos: el inhibidor de HATs 2 (Hi2) y la Remodelina (Re). El protocolo, esquematizado en la **Figura 7-A**, se describe a continuación: los ratones fueron entrenados en la tarea de EI con un shock fuerte e inyectados con vehículo, Hi2 o Re (grupos SF-veh, SF-Hi2 y SF-Re respectivamente). Como control, se utilizó un grupo shock inmediato inyectado con vehículo (SI-veh); todas las inyecciones fueron administradas inmediatamente después del entrenamiento de forma intrahipocampal (**Figura 7-B**).

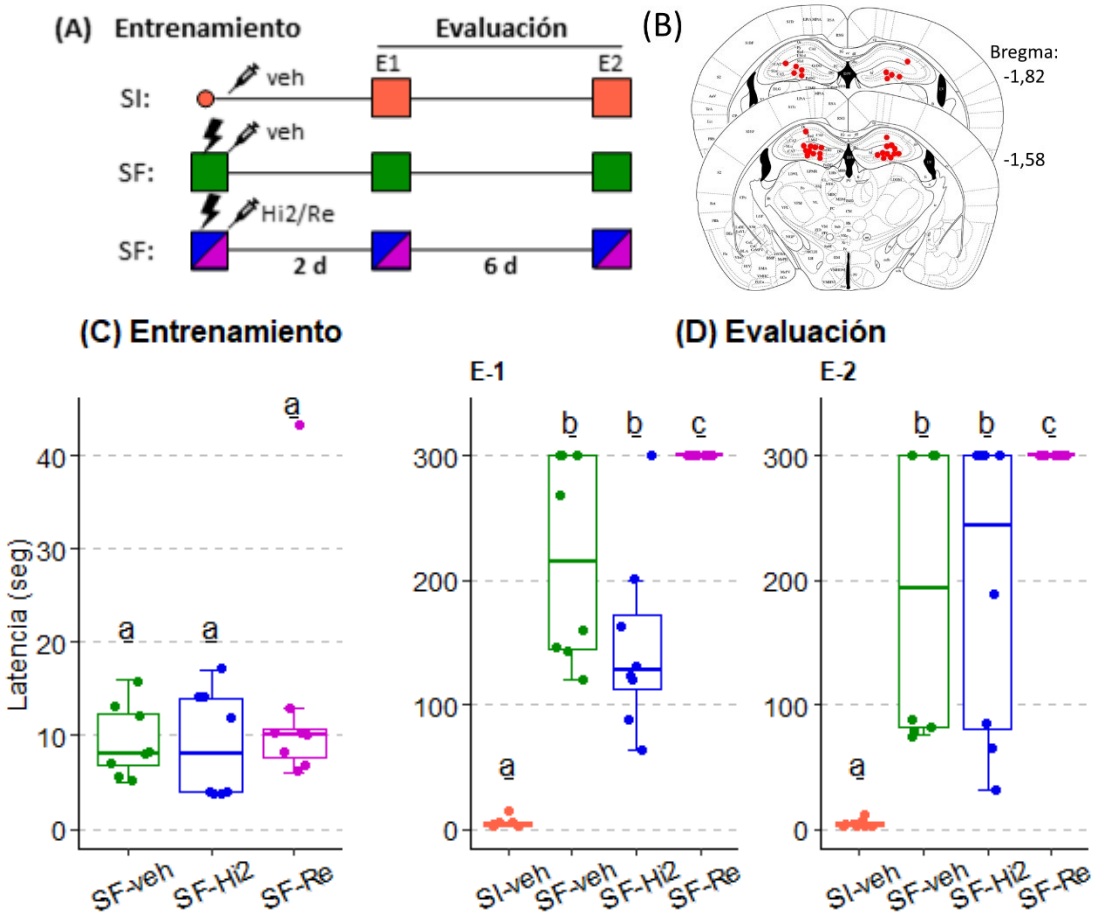


Figura 7: La Remodelina facilita la consolidación de la memoria de EI mientras que el Hi2 no muestra efecto

(A) Procedimiento experimental. **(B)** Sitios de las inyecciones. **(C)** Latencias de entrada de los grupos durante el entrenamiento y **(D)** durante la evaluación a 2 (E1) y 8 días (E2). Las letras distintas indican diferencias estadísticas significativas entre los grupos mediante prueba de Tukey (las comparaciones son intrasesión). n=8 para cada grupo.

En la sesión de entrenamiento se observaron latencias medianas (Q1; Q3) de 8 (6,7; 12,3), 8 (4; 14) y 10 s (7,8; 10,8) para los grupos SF-veh, SF-Hi2 y SF-Re respectivamente; no se obtuvieron diferencias estadísticas entre los grupos (**Figura 7-C**; Prueba de máxima verosimilitud: $\chi^2_{(2)}$ =1,643; p = 0,4398). En la primera sesión de

evaluación se registraron las siguientes latencias medianas: 4 (3; 5,3), 214 (145; 300), 127 (111,8; 172,2) y 300 s (300; 300). En la segunda sesión de evaluación se registraron las siguientes latencias medianas: 2,5 (2; 4,8), 194 (81,3; 300), 244 (80; 300) y 300 s (300; 300). La prueba de Wald sobre el modelo lineal generalizado mixto de los datos de las evaluaciones fue significativa para la variable tratamiento (**Figura 7-D**; $\chi^2_{(3)}$ = 202,635; p < 0,0001) mas no así para la variable tiempo de evaluación ($\chi^2_{(1)}$ = 1,927; p = 0,1651) ni para la interacción entre ambas variables ($\chi^2_{(3)}$ = 3,637; p = 0,3035). Esto indica que la variable tratamiento explica las variaciones observadas entre grupos y que los mismos no variaron significativamente entre las dos evaluaciones. La MME del grupo SI-veh fue de 22,1 s en E1, significativamente menor que la de los demás grupos (SF-veh: 210,5; SF-Hi2: 150,6 s; SF-Re: 321,8 s). La prueba de Tukey entre el grupo SI-veh y cada uno de los tres grupos restantes en E1 fue significativa (p < 0.0001 en cada una de las tres comparaciones). La MME de los grupos SF-veh y SF-Hi2 no se diferenciaron entre sí (p = 0,151) más si fueron significativamente menores que la del grupo SF-Re (p = 0,0035 y <0,0001, respectivamente). En la segunda sesión de evaluación (E2) se registraron resultados similares: las MME fueron 19,3, 145,8, 123,6 y 321,8 s para los grupos SI-veh, SF-veh, SF-Hi2 y SF-Re, respectivamente. La prueba de Tukey indicó diferencias significativas entre SI-veh y SF-veh, SF-Hi2, SF-Re (p < 0,0001 para cada una de las tres comparaciones); también entre SF-Re y los grupos SF-veh y SF-Hi2 (p < 0.0001 para ambas comparaciones). Los tratamientos SF-veh y SF-Hi2 no difirieron entre sí (p = 0,8578).

Estos resultados apuntan a que la administración intrahipocampal de Hi2 inmediatamente después del entrenamiento no tiene efecto sobre la consolidación de la memoria evaluada y que la administración intrahipocampal de Remodelina a este tiempo tiene un fuerte efecto facilitador de la misma.

Posteriormente, evaluamos si la administración intrahipocampal de Remodelina alteraba los niveles de AcLys (lisinas acetiladas en tubulina, desarrollado en el próximo capítulo), acetil-α-tubulina (lisina 40) o acetil-H3, 45 minutos después de su inyección en ratones *naïve* (**Figura 8**).

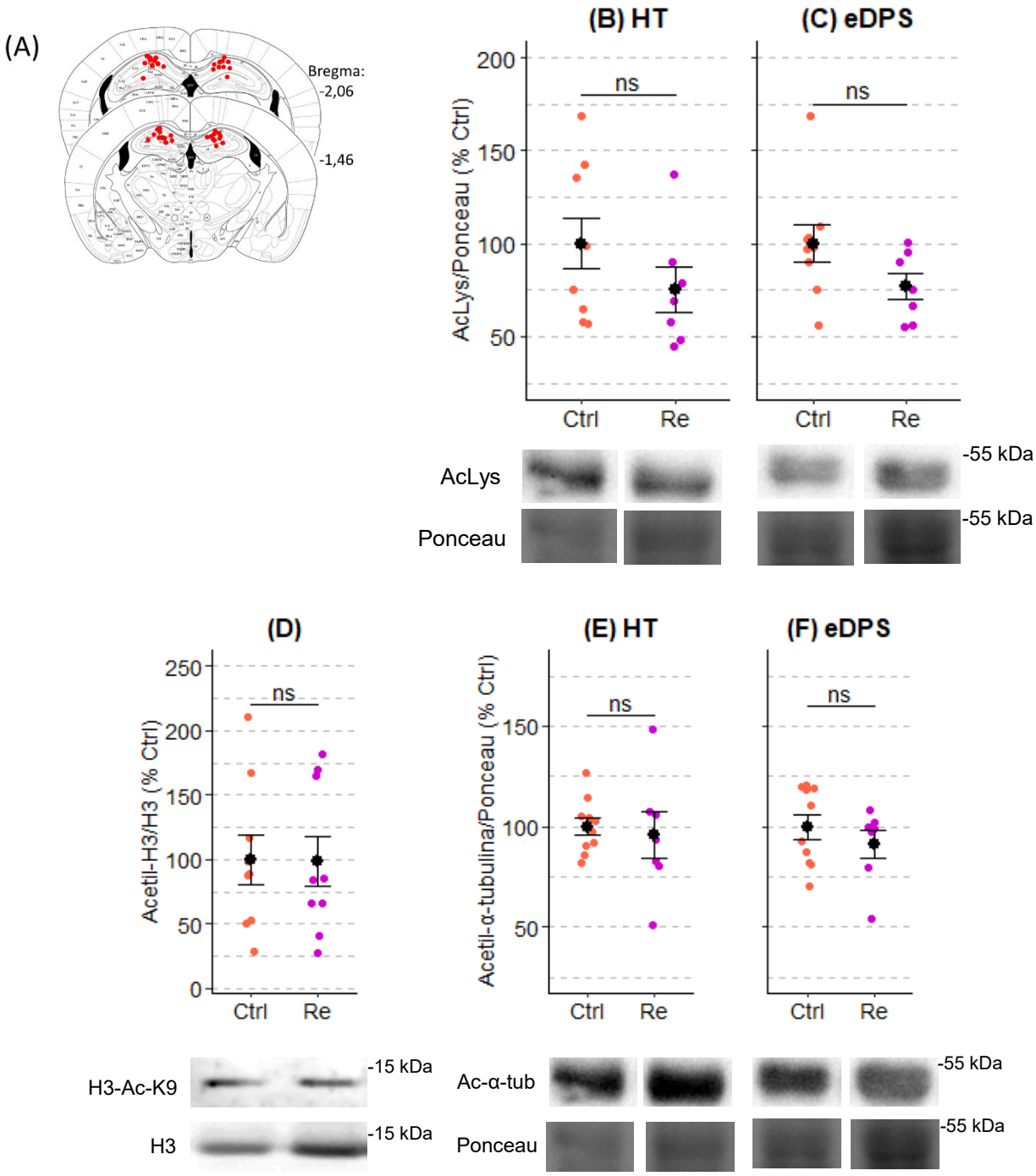


Figura 8: La Remodelina no altera los niveles de AcLys, acetil-α-tubulina ni acetil-H3 en el hipocampo de ratón 45 minutos luego de su administración

Se administró Remodelina intrahipocampal a ratones *naïve* y, luego de 45 minutos, se realizaron extractos de proteínas hipocampales en los cuales se midieron los niveles de acetilación. **(A)** Sitios de inyección. **(B)** Niveles de AcLys en homogenatos totales y **(C)** en extractos enriquecidos en densidades posinápticas. **(D)** Niveles de histona 3 acetilada. **(E)** Niveles de acetil-α-tubulina en homogenatos totales y **(F)** en extractos enriquecidos en densidades posinápticas. Con puntos negros y líneas horizontales se muestran la media ± error estándar por grupo, respectivamente. Los datos se presentan relativizados a la media del grupo Ctrl. Debajo de cada gráfico se muestran bandas representativas de AcLys, Ponceau, acetil-α-tubulina y acetil-histona 3. prueba t de Student. n= Ctrl: 9-10, TubA: 7-9.

Los niveles medios (± error estándar) de AcLys fueron 100 (13,6) y 75 (12) en extractos HT y 100 (10) y 77 (7) en extractos eDPS, para los grupos Ctrl y Re respectivamente. Estas diferencias no fueron significativas (Prueba t de Student: HT, $t_{(14)} = 1,334$; $p = 0,2035$. eDPS: $t_{(14)} = 1,753$; $p = 0,1015$). Los niveles de histona 3 acetilada no fueron estadísticamente diferentes (Media (± error estándar): Ctrl: 100 (19,4); Re: 98 (19,4). Prueba t de Student: $t_{(16)} = 0,057$; $p = 0,955$). Los valores medios (± error estándar) de acetil-α-tubulina fueron 100 (4) y 95,6 (11) en extractos HT y 100 (6) y 92 (7) en extractos eDPS, para los grupos Ctrl y Re respectivamente. Estas diferencias no fueron significativas (Prueba t de Student: HT, $t_{(15)} = 0,405$; $p = 0,6913$. eDPS: $t_{(15)} = 0,929$; $p = 0,3678$).

Estos resultados muestran que la administración intrahipocampal de Remodelina no altera los niveles de AcLys, acetil-H3 ni acetil-α-tubulina, ni en extractos totales como tampoco en extractos sinápticos, al ser evaluado 45 minutos luego de la administración.

2.4 Discusión

Los hallazgos presentados en este capítulo, primeramente, confirman que la Tubastatina A tiene un efecto facilitador sobre la consolidación de la memoria de largo término a la vez que revelan que la acción de este inhibidor específico de KDAC6 sobre la memoria tiene una ventana de acción que se cierra antes de las tres horas. Además, su aplicación directa en el hipocampo es suficiente para que ejerza su efecto facilitador. En segundo lugar, se reporta que la Remodelina tiene un efecto facilitador de la memoria de largo término. Finalmente, el inhibidor de p300 Hi2, administrado inmediatamente después del entrenamiento, no tiene efectos sobre la memoria en las concentraciones empleadas.

En un trabajo previo del laboratorio se ha mostrado que la Tubastatina A facilita la memoria de largo término cuando es administrada de forma intraperitoneal e inmediatamente después del entrenamiento de evitación inhibitoria (Esquivel, 2017). Dado que no existen reportes en la bibliografía científica sobre los efectos de la Tubastatina A sobre la consolidación de la memoria, quisimos indagar si el efecto que observábamos sobre la conducta de los animales era debido a la facilitación de la misma o un efecto inespecífico. Hay evidencia de que la TubA ejerce efectos ansiolíticos (S. Shen et al., 2020), por lo que la respuesta de animales entrenados en la tarea de EI e inyectados con TubA podría deberse a este efecto. Nuestros hallazgos muestran que este no es el caso, dado que animales que no fueron condicionados al contexto, aunque sí recibieron el estímulo aversivo y la TubA (SI-TubA), responden con bajas latencias de entrada al aparato de condicionamiento de EI. Esta respuesta es comparable con la de

animales que son expuestos por primera vez al aparato (en la fase entrenamiento) o animales con un tratamiento SI administrados con vehículo y es claramente diferente de animales condicionados al contexto (**Figura 4**).

La consolidación de memorias presenta ventanas de sensibilidad a la acción de distintos fármacos, lo que responde a la dinámica molecular de dicho proceso. Por ejemplo, el inhibidor de la vía de ERK1/2, U0 126, tiene efecto amnésico sobre la memoria de largo término cuando es administrado en el hipocampo inmediatamente o 3 después del entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria, pero no tiene efecto en tiempos intermedios o posteriores (Rossato et al., 2004). De forma similar, la administración de anisomicina, un inhibidor de la síntesis proteica, tiene un efecto amnésico sobre la memoria de largo término cuando es administrada en el hipocampo en tiempos cercanos al entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria y entre 3 y 6 horas más tarde (Igaz et al., 2002). También en esta tarea la inhibición de NK-κB por sulfasalazina suprime la retención de la memoria inmediatamente después del entrenamiento pero no luego de 3 horas (Freudenthal et al., 2005). La acción de la TubA fue evaluada en dos tiempos en este trabajo, inmediatamente y 3 horas después del entrenamiento (**Figura 5**). Hallamos efecto sobre la memoria de largo término únicamente cuando la droga fue administrada inmediatamente después del entrenamiento. Esto sugiere que KDAC6 tiene un rol relevante en la consolidación temprana de la memoria. En un estudio en ratas de 2014 se observó que la TSA, inhibidor inespecífico de KDACs (KDAC6 incluida), administrada en el hipocampo luego de 0 o 3 horas del entrenamiento, causaba una facilitación de la memoria de largo término en la tarea de evitación inhibitoria. Este efecto no se observaba cuando la TSA era administrada 1,5 o 6 horas luego del entrenamiento (Blank et al., 2014). Estas observaciones refuerzan la idea de que KDAC6 es relevante en la consolidación temprana de la memoria, pero no en tiempos más tardíos. Que la TSA tenga efecto también a las 3 horas podría explicarse por la inhibición de KDACs nucleares que regulan la transcripción. Este efecto facilitador temprano se observa también con otros inhibidores como el crebinostat (que inhibe a KDAC1, 2, 3 y 6; Dama & Sharma, 2024) y el butirato de sodio (inhibidor de KDACs de clase I y IIa; Blank et al., 2014).

Una misma vía molecular o proteína presente en las distintas regiones del cerebro que participan de la consolidación de una memoria puede presentar dinámicas de acción diferentes en cada una de esas regiones. Como se mencionó en el párrafo anterior, la inhibición de la vía de ERK1/2 en el hipocampo a 0 y 3 horas después del entrenamiento produce amnesia, pero cuando la inhibición es en la corteza entorrinal o en la corteza cingulada posterior el efecto se ve, adicionalmente, a las 0,5 y 1,5 horas;

cuando la inhibición es en la corteza parietal posterior el efecto amnésico se observa a 0, 1,5, 3 y 6 horas (Rossato et al., 2004). La inhibición de KDACs con TSA en la amígdala produce facilitación de la memoria de largo término cuando la infusiones se dan 1,5, 3 o 6 horas pero no inmediatamente después del entrenamiento (Valiati et al., 2017). Como ya hemos citado, la TSA intrahipocampal facilita la memoria de evitación inhibitoria a 0 o 3 pero no 1,5 o 6 horas después del condicionamiento (Blank et al., 2014). Nuestros resultados revelan que la inhibición de KDAC6 en el hipocampo e inmediatamente después del entrenamiento es suficiente para facilitar la consolidación de la memoria de largo término (**Figura 6**). Esto implica que alguna o algunas de las proteínas blanco de KDAC6 cambian sus niveles de acetilación en respuesta a los procesos moleculares asociados a la formación de memorias. Este asunto será abordado en el siguiente capítulo.

El uso de inhibidores de KDACs es una estrategia ampliamente difundida para el estudio del rol de dichas enzimas en los procesos de memoria, mas no así el uso de inhibidores de KATs. Un estudio realizado en abejas reporta un efecto amnésico del garcinol, inhibidor de p300 y PCAF, sobre la consolidación de largo término de una memoria asociativa olfatoria. También se reportó un efecto amnésico del c646, inhibidor específico de p300, sobre la memoria de corto y de largo término. A su vez, la administración conjunta de actinomicina D, un intercalante de ADN que inhibe la transcripción, abolió el efecto amnésico del garcinol pero no el del c464. Los autores argumentan que las KATs intervienen en la consolidación de la memoria por mecanismos dependientes e independientes de transcripción génica, es decir acetilando proteínas histonas y no histonas, respectivamente (Merschbaecher et al., 2016). Los mismos inhibidores también muestran efecto amnésico sobre la memoria de largo término en ratas (Maddox, Watts, Doyère, et al., 2013; Maddox, Watts, & Schafe, 2013). En este trabajo hallamos, por un lado, que el inhibidor de HATs-2 (Hi2), un potente inhibidor de p300 (Costi et al., 2007), no mostró efecto sobre la consolidación de la memoria de EI (**Figura 7**). La Remodelina, por otro lado, mostró un efecto facilitador de la memoria. Existe poca evidencia sobre cuál o cuáles son las proteínas blanco de este inhibidor. Las empresas que lo comercializan declaran que es un inhibidor de la KAT NAT10. Esta asociación fue realizada en una investigación sobre laminopatías en un modelo celular (Larrieu et al., 2014). En el mencionado estudio encuentran que la remodelina interactúa con NAT10 en ensayos de *pull-down*, y que tanto mutantes de NAT10 para su actividad acetiltransferasas como el uso de Remodelina eran capaces de rescatar los efectos del modelo de laminopatía sobre la morfología nuclear. Resultados similares fueron hallados empleando células derivadas de pacientes con

laminopatías. Los investigadores también presentan evidencia de que la NAT10 tiene capacidad de acetilar tubulina. Por otro lado, el mismo año se reportó que la NAT10 es capaz de catalizar la acetilación de ARN (Ito et al., 2014). Luego, en 2021 se publicó un estudio en Cartas de Química Medicinal ACS donde los autores concluyen que efectivamente la NAT10 tiene capacidad de acetilar ARN y, en menor medida, tubulina. Sin embargo, según los autores del trabajo, la Remodelina no tiene capacidad de inhibir la acetilación de ARN dependiente de NAT10 ni de unirse a su sitio de acetiltransferasa (Shrimp et al., 2021). Se reporta también en el mismo estudio que la Remodelina tendría capacidad de interactuar con múltiples proteínas en la célula. Nuestros resultados muestran un claro efecto facilitador de la Remodelina, aunque queda por dilucidar su mecanismo de acción. Los datos presentados en la **Figura 8** muestran que la Remodelina administrada de forma intrahipocampal en ratones *naïve* no afecta los niveles de AcLys ni acetil-α-tubulina en extractos totales ni eDPS, como tampoco los niveles de acetil-H3, al menos 45 minutos luego de su administración. Esto apoya la idea de que el efecto facilitador de la Remodelina podría ser mediante modificaciones del ARN.

Capítulo 3: Modulación de la acetilación de tubulina hipocampal

3.1 Introducción

3.1.1 Microtúbulos y tubulina

Los microtúbulos (MT) son estructuras cilíndricas y huecas que constituyen uno de los tres componentes del citoesqueleto filamentoso de todas las células animales (**Figura 9**). Son polímeros proteicos conformados por dímeros de las proteínas globulares α-tubulina y β-tubulina. Los MT participan en varias funciones celulares, como el transporte intracelular, la división y el movimiento. En las neuronas, los MT forman paquetes densos que recorren todo el largo de los axones y las dendritas (Schätzle et al., 2018).

Los MT están polarizados, con un extremo "mas" (β-tubulina) y un extremo "menos" (α-tubulina). El extremo mas tiene una tasa de crecimiento rápida mientras que el extremo menos tiene una tasa de crecimiento lenta. En los axones, el extremo mas se orienta en sentido distal respecto del soma, mientras que en las dendritas la orientación es mixta (Waites et al., 2021).

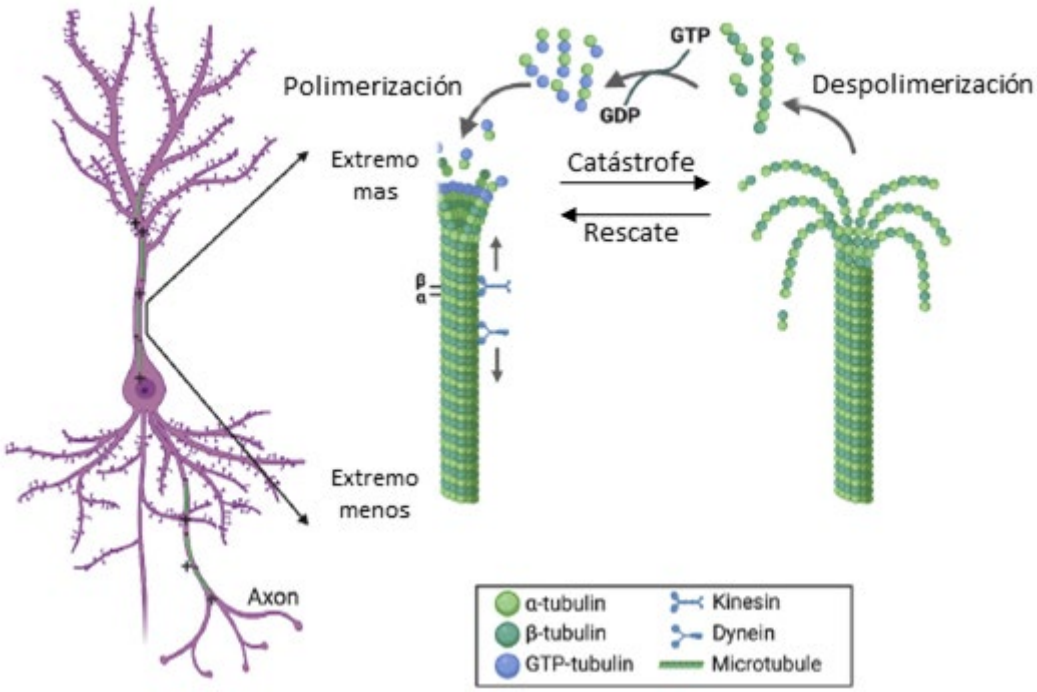


Figura 9: Los microtúbulos son estructuras dinámicas
Las neuronas poseen MT acentrosomales conformados por dímeros de α- y β-tubulina. Son filamentos polarizados con un extremo mas (β-tubulina) y un extremo menos (α-tubulina). En los axones, el extremo mas se orienta en sentido distal respecto del soma, mientras que en las dendritas la orientación es mixta. Los MT poseen inestabilidad dinámica, cualidad por la cual pasan

de una fase de crecimiento a una de acortamiento (catástrofe) y viceversa (rescate). (Modificado de Waites et al., 2021).

La polimerización de lo MT ocurre a partir de dímeros de tubulina solubles unidos a trifosfato de guanosina (GTP, por sus siglas en inglés). Una vez incorporados los dímeros, es activada la actividad GTPasa de la β-tubulina y el GTP es hidrolizado a difosfato de guanosina (GDP, por sus siglas en inglés). La mayor parte de los heterodímeros de un MT están unidos a GDP, excepto el extremo mas, que suele presentar heterodímeros unidos a GTP, lo cual ayuda a estabilizar al MT en su totalidad. Cuando el MT acumula una cantidad crítica de heterodímeros unidos a GDP en el extremo mas, el MT se vuelve inestable y se despolimeriza. Este proceso se conoce como catástrofe. Los MT alternan entre estados de despolimerización y de polimerización, una cualidad conocida como inestabilidad dinámica de los MT (Carmona et al., 2023).

La inestabilidad dinámica de los MT es modulada por los motores dependientes de MT dineína y kinesina, proteínas asociadas a MT (MAPs, por sus siglas en inglés) y modificaciones postraduccionales (MPT). Estas últimas pueden ser fosforilaciones, poliaminaciones, tirosinaciones y acetilaciones, entre otros. La mayoría de estas MPT suceden en residuos C-terminales expuestos en la cara externa del MT. Una excepción a esta regla es la acetilación de la lisina 40 de α-tubulina, la cual se encuentra en la cara interna del MT (lumen) (Waites et al., 2021).

La acetilación de la lisina 40 (K40) es conocida como sitio canónico en estudios de acetilación de tubulina. En muchos de los reportes en la bibliografía científica donde la acetilación de tubulina es estudiada, se emplean anticuerpos que reconocen la acetilación sobre K40. Estos anticuerpos fueron sintetizados a partir de un mismo clon, el 6-11B-1 (*Acetylated Alpha Tubulin Anticuerpo (6-11B-1) | SCBT - Santa Cruz Biotechnology*). Sin duda que K40 no es el único residuo que puede ser acetilado; otras lisinas acetilables de ratón son K60, K112, K124, K352 y K370 en α-tubulina y K58, K103, K154, K174 y K216 de y K394 en β-tubulina (**Figura 10**). En humanos se han descubierto aún más. Las funciones de todas estas modificaciones y las enzimas que las regulan todavía no se conocen por completo (N. Liu et al., 2015).

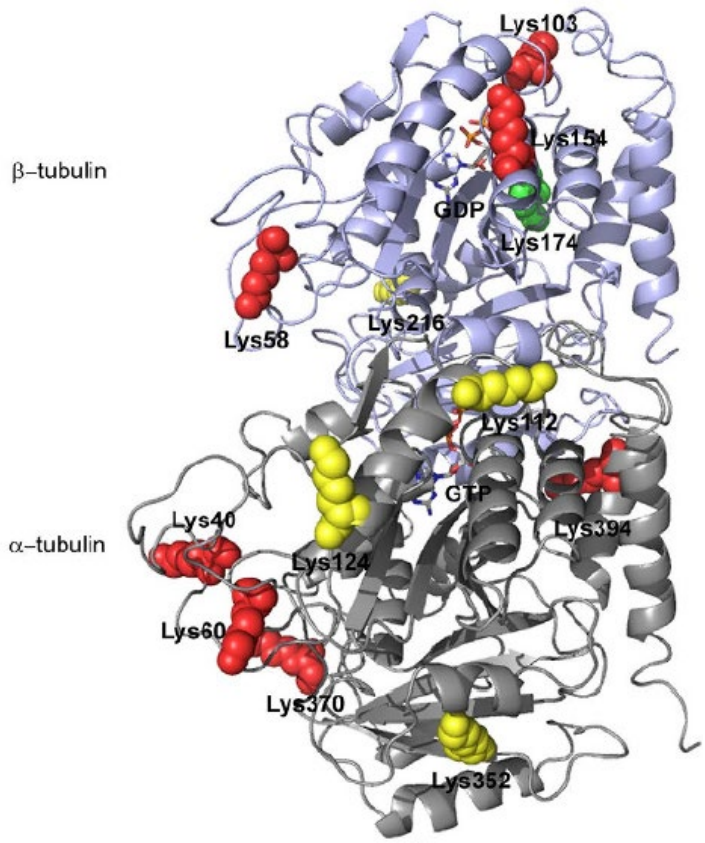


Figura 10: Representación estructural de la tubulina de ratón mostrando la distribución de lisinas acetilables identificadas
Todas las esferas de colores identifican las lisinas acetilables conocidas, tanto en α-tubulina como en β-tubulina. Las de color rojo marcan los sitios que son sustrato de la actividad de KDAC6. Las esferas verdes marcan los sitios no relacionados a la actividad de KDAC6. Las esferas amarillas marcan sitios cuya relación con la actividad de KDAC6 es desconocida. (Modificado de Liu et al., 2015).

La acetilación de tubulina afecta tanto su estructura como sus funciones. Por un lado, se ha observado que los MT acetilados son más resistentes a los agentes despolimerizantes, como el frío o el nocodazol. Observaciones como esas han llevado a la conclusión de que la acetilación estabiliza a los MT aunque este efecto también se le ha atribuido a la unión de KDAC6 a los MT, unión que aumenta cuando la enzima es inhibida (Asthana et al., 2013). Se ha propuesto que la acetilación de K40 aumenta la flexibilidad de los MT y por lo tanto su resistencia al estrés mecánico. La acetilación de K40 induciría cambios conformacionales que causan una interacción más débil entre los monómeros de tubulina, haciéndola más resistente a las fuerzas mecánicas (Cueva et al., 2012). Por otro lado, la acetilación de MT afecta al tráfico intracelular. En dendritas, los motores moleculares kinesina 1 y kinesina 3 mueven cargas en sentido retrógrado sobre MT altamente acetilados y en sentido anterógrado sobre MT con baja acetilación, respectivamente (Tas et al., 2017). También se ha observado que la acetilación de los MT afecta su interacción con MAPs, como tau (G. Lee & Rook, 1992).

La acetilación de tubulina es un proceso reversible. La principal enzima KAT del sitio K40 es aTAT1 (Shida et al., 2010). Otras KATs que acetilan K40 son el complejo ARD1-NAT1, Elp3, GCN5 y NAT10 (Conacci-Sorrell et al., 2010; Creppe et al., 2009; Ohkawa et al., 2008; Q. Shen et al., 2009). El residuo K252 de β-tubulina es acetilado por la enzima San (Chu et al., 2011). La deacetilación es llevada a cabo por dos enzimas, KDAC6 y SIRT2. Ambas enzimas son capaces de actuar tanto sobre tubulina soluble como sobre tubulina polimérica, aunque KDAC6 tiene preferencia por la primera (Hubbert et al., 2002; Matsuyama et al., 2002; Miyake et al., 2016; North et al., 2003; Zhao et al., 2010).

3.1.2 Rol de los MT en plasticidad sináptica y memoria

Los cambios dinámicos en el citoesqueleto subyacen a la plasticidad sináptica, la cual, a su vez, subyace a los procesos de memoria y aprendizaje. La dinámica de los MT es alterada por fenómenos de plasticidad. En un estudio *in vitro* en neuronas y rebanadas de hipocampo de rata, se observó que los MT ingresan preferentemente a espinas dendríticas que se encuentran atravesando una reorganización del citoesqueleto de actina dependiente de actividad sináptica. En más detalle, la aplicación de metacolina (un agente que induce potenciación de largo término, LTP por sus siglas en inglés) con y sin tetrodotoxina (reduce la actividad neuronal bloqueando los canales de sodio dependientes de voltaje), por un lado, y la aplicación de NMDA con tetrodotoxina, por otro lado, aumentan las entradas de los MT a las espinas dendríticas (Schätzle et al., 2018). Observaciones similares se realizaron en cultivos disociados de neuronas de hipocampo de ratón (Merriam et al., 2013).

En cuanto a memoria y aprendizaje, se ha demostrado que afectar la estabilidad de los MT causa deficiencias en la formación de memorias. Una demostración de ello la han logrado investigadores que generaron ratones mutantes *knockout* para la proteína stathmin, la cual regula negativamente a los MT y es abundante en la amígdala lateral. Esta mutación ocasiona MT más estables, por lo tanto, menos dinámicos. Los ratones *knockout* para stathmin mostraron ser deficientes en LTP y en memoria de miedo a largo término (Shumyatsky et al., 2005). En consonancia con lo previo, se ha concluido que los cambios en la tasa de recambio de los MT en el hipocampo son necesarios para, y un marcador de, plasticidad sináptica subyacente a la formación de memorias (Fanara et al., 2010). Los investigadores utilizaron un isótopo estable para medir la tasa de recambio de tubulina y encontraron que el aprendizaje de miedo condicionado inducía un aumento en la tasa de recambio de la tubulina asociada a la Proteína 2 Asociada a MT (MAP2 por sus siglas en inglés; marcador de tubulina dendrítica) y de la tubulina resistente al frío (MT hiper-estables presentes solamente en neuronas). El tratamiento

con nocodazol (agente despolimerizante de MT) impedía la incorporación del isótopo estable a los MT y la formación de memoria. Los efectos del nocodazol sobre los MT y la memoria eran rescatados con la aplicación del agente estabilizante de MT, Taxol.

Podemos decir, basados en la evidencia bibliográfica, que los cambios morfológicos y moleculares en la sinapsis son sustrato de los procesos de memoria y aprendizaje y que la dinámica de los MT participa activamente en estos cambios y procesos.

3.1.3 Proteína de densidad posináptica 95 (PSD95)

La Proteína de la Densidad Posináptica 95 (PSD95, por sus siglas en inglés) pertenece a la superfamilia de guanilato quinasas asociadas a membrana (MAGUK, por sus siglas en inglés) y es el miembro mejor caracterizado. Estructuralmente, posee tres dominios PDZ, un dominio SH3 y un dominio guanilato quinasa, los cuales funcionan como dominios de interacción proteína-proteína. PSD95 pertenece al grupo de proteínas conocidas como proteínas de andamiaje, ya que funcionan como andamios que ensamblan complejos moleculares grandes en sitios específicos de la célula (Kim & Sheng, 2004).

PSD95 es un componente principal de la densidad posináptica y un marcador de sinapsis excitatorias. Interactúa con los receptores de glutamato tipo AMPA y NMDA, como así también con proteínas del citoesqueleto como actina y tubulina (Dosemeci et al., 2007). Particularmente, con los MT interactúa por intermedio de la proteína EB3 (Sweet et al., 2011).

PSD95 participa en procesos de plasticidad sináptica y memoria. En un modelo *knockdown* para PSD95 con ARN interferente *in vitro*, se observó que niveles reducidos de PSD95 llevaban a un menor crecimiento en el tamaño de espinas dendríticas tras una LTP inducido químicamente, a su vez que aumentaba el recambio de las espinas. Los autores del trabajo concluyeron que niveles apropiados de PSD95 son necesarios para la estabilización de las sinapsis en fases iniciales, aunque no para inducción ni expresión temprana, de la potenciación sináptica (Ehrlich et al., 2007). El mismo grupo de investigación describió unos años antes que PSD95 controla la externalización de receptores de glutamato tipo AMPA tanto durante la LTP como en la plasticidad sináptica inducida por la experiencia (Ehrlich & Malinow, 2004). En situaciones de aprendizaje, se observó que la tarea espacial de MWM induce el reclutamiento de receptores de glutamato tipo NMDA y PSD95 a balsas lipídicas, las cuales son regiones de la membrana plasmática que participan de la transducción de señales y la compartimentalización de la membrana (Delint-Ramírez et al., 2008). Se encontró que

PSD95 es importante para la formación de memorias de miedo precisas y para el mantenimiento de memorias remotas, aunque no para formación y expresión de memorias de largo término recientes (Fitzgerald et al., 2015). Empleando la tarea de evitación inhibitoria, se observó que el anestésico Sevoflurano impedía la formación de memorias de corto término de forma dependiente de la expresión de PSD95 y receptores AMPA en el hipocampo de ratones (Jiao et al., 2019).

El estudio de proteínas de la sinapsis puede abordarse a partir de extractos de cerebro que son sometidos a centrifugaciones diferenciales y al tratamiento con detergentes. La fuerza del detergente empleado afecta la posibilidad de obtener extractos sinápticos cuyas interacciones proteína-proteína se mantengan intactas o no (Lautz et al., 2019). En este trabajo empleamos un protocolo de fraccionamiento subcelular a partir de hipocampo de ratón, los cuales son tratados con los detergentes Tritón 1% y luego con LDS 3%. El primer tratamiento con tritón no es suficientemente fuerte como para desarmar los agrupamientos proteicos fuertemente unidos pero el tratamiento con LDS si lo es, evidenciado por la ausencia y presencia de PSD95 en membranas de Western Blot, respectivamente (Salles et al., 2015). Estos extractos enriquecidos en PSD95 (extractos enriquecidos en densidades posinápticas, eDPS) nos permiten evaluar la cantidad relativa de PSD95 en dicha fracción subcelular. A su vez, la relación de la cantidad de PSD95 en extractos eDPS con la cantidad en extractos totales nos da una medida del agrupamiento o *clustering* de PSD95. Es decir, la cantidad de PSD95 en extractos eDPS son un reflejo del PSD95 que se encontraba fuertemente unido y resistió al tratamiento con tritón. Luego, la cantidad de PSD95 en eDPS relativizada a la cantidad total de PSD95 en el tejido (extracto total) refleja, en alguna medida, cuánto PSD95 mantenía fuertes uniones resistentes a tritón del total de PSD95 en el tejido.

En esta sección del trabajo nos propusimos estudiar la capacidad de inhibidores de KDACs de preservar la acetilación de tubulina *in vitro* y el efecto de la TubA sobre la acetilación de tubulina *in vivo.* También estudiamos los cambios inducidos por el entrenamiento de EI y la TubA sobre la acetilación de tubulina, de histona 3 y sobre los niveles y el *clustering* de PSD5, tanto a 15 como a 45 minutos luego del entrenamiento.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Animales

Se utilizaron ratones macho CF-1 (Fundacal, Buenos Aires, Argentina) de 60-70 días de edad y 25-30 g de peso corporal. Para el experimento cuyos resultados se muestran en la **Figura 16** se utilizaron machos y hembras CF-1. Fueron alojados en

grupos de 4 a 5 animales (sexos separados) y permanecieron alojados de esa manera durante los procedimientos experimentales. Los ratones se mantuvieron en una habitación mantenida entre 21 y 23°C en un ciclo de luz y oscuridad de 12 h (las luces se encienden a las 6:00 a. m.) con acceso *ad libitum* a alimento seco y agua del grifo. Los experimentos se realizaron de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del *National Institute of Health* de Estados Unidos (publicación NIH nº 80-23/96) y con la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (Protocolo experimental nº 173). Se hicieron todos los esfuerzos posibles para minimizar el sufrimiento de los animales y reducir el número de animales utilizados.

3.2.2 Drogas

Para los ensayos con inhibidores de KDACs *in vitro* se utilizaron las siguientes concentraciones finales: TSA: 3,3 μM, TubA: 8 μM y NaB: 5mM.

En los experimentos de inyecciones sistémicas, los ratones recibieron inyecciones intraperitoneales de Tubastatina A (TubA; Cayman Chemical; 40 mg/kg) disuelta en vehículo (veh; DMSO 15 %, PEG 10 %, TWEEN-20 2 % y solución salina), o un volumen equivalente de solución vehículo. El volumen inyectado fue de 300 μl.

3.2.3 Evitación inhibitoria

La tarea se desarrolló como se describe en la **sección 2.2.4**, con la diferencia de que no se evaluó la memoria. Tras 15 o 45 minutos desde el entrenamiento, los animales fueron sacrificados, se extrajeron los hipocampos y se realizaron extractos de proteínas como se indica en la siguiente sección.

Para algunos experimentos se utilizaron animales *naïve* (N), los cuales no tuvieron contacto con el dispositivo experimental en ningún momento ni recibieron shock eléctrico.

3.2.4 Extractos de proteínas hipocampales

Los extractos se realizaron como se describen en la **sección 2.2.5**.

Los buffers de extracción contenían los siguientes inhibidores: de proteasas, aprotinina 0,8 μM; pepstatina A 1,5 μM; fluoruro de fenilmetansulfonilo (PMSF) 0,5 mM; leupeptina 23 μM; de fosfatasas y quinasas: ortovanadato 0,2 mM; a menos que se indique lo contrario, de deacetilasas: tricostatina A 3,3 μM.

3.2.5 Western blot

El contenido de proteínas de los extractos se midió por duplicado con el kit de reactivos de ensayo de proteínas BCA (Thermo Scientific, Waltham, MA, EEUU). Para los ensayos de Western Blot, se añadió buffer de carga a las muestras que luego se incubaron a 95 °C durante 5 minutos y se colocaron inmediatamente en hielo. Se procesaron cantidades iguales de proteína para cada muestra mediante SDS-PAGE con 10% de acrilamida en el gel de resolución. Luego, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF para inmunotransferencia. La inmunomarcación se realizó con anticuerpos anti-lisina acetilada (AcLys; CST-9441S, dilución 1:1000), anti-α-tubulina (Santa Cruz Biotechnology Inc., SCBT-23948, dilución 1:7000), anti-α-tubulina acetilada (SCBT-23950, dilución 1:8000), siguiendo los protocolos de los fabricantes. Se utilizó el anticuerpo de la proteína sináptica anti-PSD95 (NeuroMab, K28/43, dilución 1:1000). Con los extractos nucleares se utilizaron los anticuerpos anti-histona 3 (STJ96940, dilución 1:2000) y anti-histona 3 acetilada en la lisina 9 (STJ90121, dilución 1:2000). La detección del anticuerpo secundario unido a HRP anti-ratón (CST-7076, dilución 1:10000) o anti-conejo (SCBT-2030, dilución 1:5000) se realizó con el kit Advance ECL (GE Healthcare, Amersham, BM, Reino Unido) como lo describe el fabricante y las señales se capturaron usando Amersham Imager 600 (GE Healthcare, Amersham, BM, Reino Unido). La fluorescencia de los anticuerpos secundarios IRDye 680RD e IRDye 800RD (LI-COR Biosciences) se capturó utilizando el sistema de imágenes Odyssey (LI-COR Biosciences). La densidad óptica (OD) se estimó utilizando el software ImageJ 1.53c.

3.2.6 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados usando modelos lineales generales y modelos lineales generales mixtos.

Dado que algunos experimentos se realizaron en dos o tres días distintos o hay machos y hembras, inicialmente se modelaron modelos lineales mixtos para todos los experimentos y variables respuesta, con los días de experimento o el sexo de los animales como variable de efectos aleatorios. Luego se evaluó el término aleatorio del modelo con el comando `'ranova()'` del paquete lmerTest (Kuznetsova et al., 2017); si la prueba para el término aleatorio no era significativa entonces se pasaba a un modelo sin dicho término (parsimonia).

Los análisis de los datos presentados en las **Figura 12-A-D, Figura 13-C Figura 14-A-H, Figura 15-A-E, G-H y Figura 16-A-B** se realizaron ajustando un modelo lineal general.

Los análisis de los datos presentados en la **Figura 13-A-B** y **Figura 15-H** fueron realizados con un modelo lineal general con pruebas de valores atípicos significativas (*outliers*). Dado que no existían razones en la obtención de los datos para remover esos valores, se analizaron modelos sin los mismos para comprobar si esa manipulación cambiaba la significancia de las pruebas de hipótesis. En ninguno de los tres casos el modelo sin valores atípicos logró que la significancia cruzara el punto de corte (es decir, que si el p-valor era menor o mayor a 0,05 en el primer modelo, seguía siendo menor o mayor en el modelo sin valores atípicos). En estos casos, se mantuvo el modelo con valores atípicos.

La prueba de hipótesis para los datos presentados en la **Figura 13-D** se realizó mediante prueba t de Welch.

Los análisis de los datos presentados en la **Figura 15-F** fueron realizados con un modelo lineal general mixto, con los días de experimento como variable de efecto aleatorio. Las diferencias entre grupos se analizaron mediante las pruebas de Wald y *post hoc* de Tukey.

El análisis estadístico y las figuras fueron generados usando los softwares R y Rstudio (Posit team, 2023; R Core Team, 2023). Se emplearon los paquetes stats y lme4 para el modelado y Dharma para corroborar los supuestos de los modelos (Bates et al., 2015; Harting, 2022). Para la prueba de hipótesis de diferencias entre grupos se realizaron las pruebas t de Student para dos grupos y análisis de la varianza (ANOVA) para más de dos grupos, utilizando los comandos `‘t.test()’` y `‘anova()’` del paquete stats y las comparaciones múltiples se realizaron con la prueba de Tukey utilizando el paquete emmeans (Lenth, 2023). Los gráficos se realizaron empleando los paquetes ggplot2, gggsignif y patchwork (Ahlmann-Eltze & Patil, 2021; Pedersen, 2024; Wickham, 2016).

3.3 Resultados

Para estudiar la acetilación empleamos dos anticuerpos, uno que reconoce lisinas acetiladas independientemente de la identidad de la proteína (AcLys; Cell Signaling CST-9441S) y otro que reconoce a la lisina 40 acetilada de α-tubulina (acetil-α-tubulina; Santa Cruz, SCBT-23950, clon 6-11B-1), este residuo es el canónico en estudios de acetilación de α-tubulina. Evaluamos las bandas que reconocía el anticuerpo anti-AcLys en extractos totales de proteínas de hipocampo de ratón (**Figura 11**). Encontramos una banda principal alrededor de 50 kDa, la cual se superpone con la señal de α-tubulina. Dada esta observación y la abundancia de tubulina en el tejido nervioso, concluimos que la banda reconocida por el anti-AcLys corresponde a tubulina.

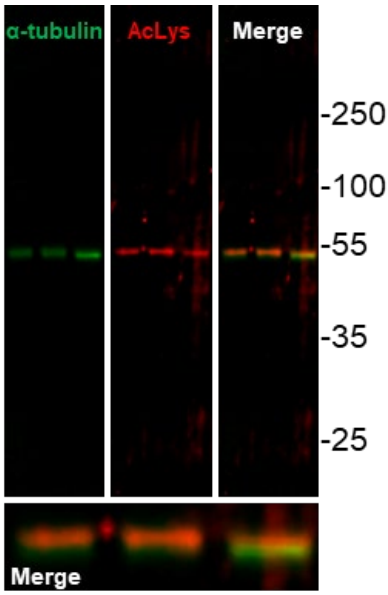


Figura 11: La señal de AcLys se superpone con la señal de α-tubulina
Extractos totales de tres ratones *naïve* corridos en WB y revelados contra α-tubulina (verde, panel de la izquierda) y AcLys (rojo, panel central). Ambos anticuerpos marcan una banda única alrededor de 50 kDa; ambas señales se superponen (panel de la derecha). En el panel inferior se muestra ampliada la banda superpuesta del panel derecho (merge). n= 3.

3.3.1 Capacidad de los inhibidores de KDACs de preservar la acetilación de tubulina

A continuación, estudiamos la capacidad de los inhibidores TSA, TubA y NaB de preservar la acetilación de tubulina en extractos totales y enriquecidos en densidades posinápticas, *in vitro* (HT y eDPS, respectivamente). Extractos sin inhibidores se usaron como controles. Luego se cuantificaron los niveles de AcLys y acetil-α-tubulina.

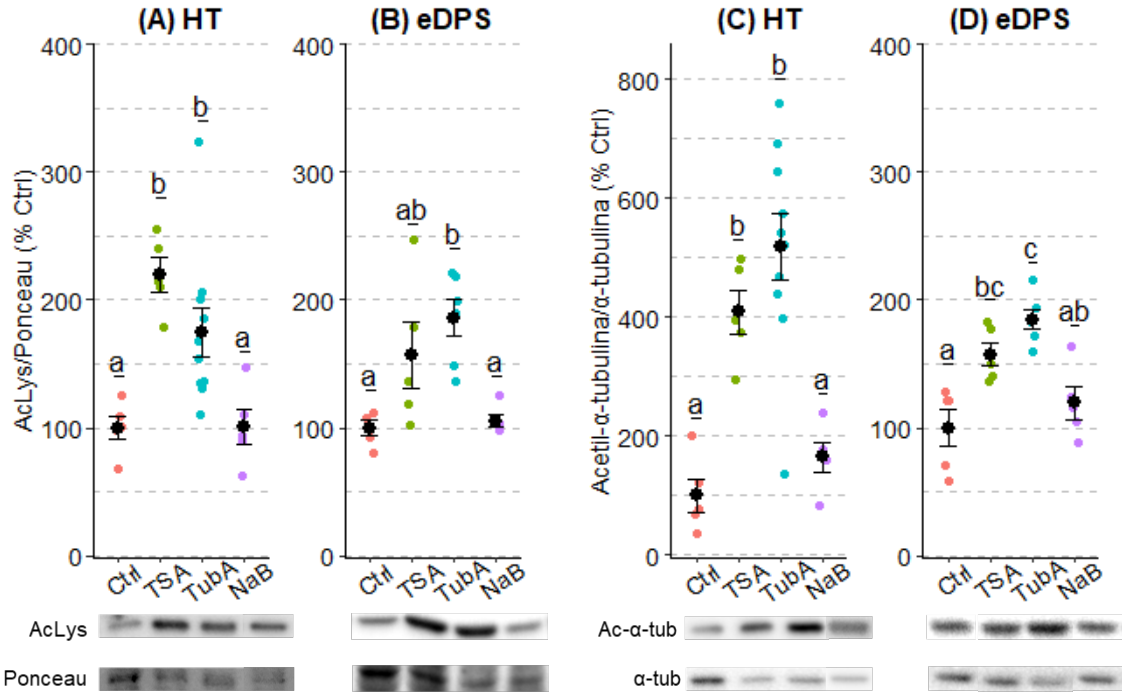


Figura 12: El tratamiento con TSA y TubA preserva la acetilación de tubulina en extractos hipocampales, pero no así el NaB
Se trataron extractos de proteínas hipocampales de ratón con inhibidores de deacetilasas (TSA, TubA o NaB). **(A)** Niveles de AcLys en homogenatos totales y **(B)** en extractos enriquecidos en densidades posinápticas. **(C)** Niveles de acetil-α-tubulina en homogenatos totales y **(D)** en extractos enriquecidos en densidades posinápticas. Con puntos negros y líneas horizontales se muestran la media ± error estándar por grupo, respectivamente. Los datos se presentan relativizados a la media del grupo Ctrl. Las letras distintas indican diferencias estadísticas significativas entre los grupos mediante la prueba de Tukey. Debajo de cada gráfico se muestran bandas representativas de AcLys, Ponceau, acetil-α-tubulina y α-tubulina. n= Ctrl: 5, TSA: 5, TubA (HT): 10, TubA (eDPS): 6, NaB: 5.

Los niveles medios (± error estándar) de AcLys en extractos HT variaron entre 100 (9,4), 220 (13,2), 175 (19,3) y 101 (13,9) para los grupos Ctrl, TSA, TubA y NaB, respectivamente. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas (**Figura 12-A**; ANOVA: $F_{(3, 21)} = 8{,}996$; $p = 0{,}0005$). Los grupos TSA y TubA aumentaron significativamente la acetilación respecto al grupo control (Prueba de Tukey: Ctrl - TSA: $p = 0{,}0021$. Ctrl - TubA: $p = 0{,}029$); a su vez estos dos primeros grupos no mostraron diferencias estadísticas significativas entre sí (TSA - TubA: $p = 0{,}2958$). Los extractos tratados con NaB mostraron niveles de AcLys significativamente menores que los tratados con los otros inhibidores (TSA - NaB: $p = 0{,}0023$. TubA - NaB: $p = 0{,}0316$) y similares a los niveles del grupo control (Ctrl - NaB: $p = 0{,}999$). Los extractos eDPS también mostraron cambios en los niveles medios (± error estándar) de AcLys (**Figura 12-B**; ANOVA: $F_{(3, 17)} = 7{,}563$; $p = 0{,}002$), variando entre 100 (5,8), 157 (26), 186 (14,5) y 105 (5,1) para los grupos Ctrl, TSA, TubA y NaB, respectivamente. El tratamiento con TubA fue el único que logró un aumento significativo de AcLys respecto al grupo Ctrl (Ctrl - TubA: $p = 0{,}0043$), aunque el tratamiento con TSA mostró una tendencia al aumento (Ctrl - TSA: $p = 0{,}0869$). Los grupos TSA y TubA no se diferenciaron estadísticamente entre sí (TSA - TubA: $p = 0{,}5333$). Los extractos tratados con NaB mostraron niveles de AcLys significativamente menores que los tratados con TubA (TubA - NaB: $p = 0{,}0073$) y sin diferencias significativas con los grupos Ctrl y TSA (Ctrl - NaB: $p = 0{,}9947$. TSA - NaB: $p = 0{,}1351$). Hasta acá, hemos visto que el uso de drogas con capacidad de inhibir KDAC6 preservan los niveles de AcLys en extractos totales de proteínas hipocampales, siendo la TubA la más eficientes en preservar la acetilación en extractos eDPS. El NaB no muestra capacidad de preservar los niveles de AcLys en estos extractos.

En cuanto a la señal de acetil-α-tubulina, sus niveles medios (± error estándar) variaron entre 100 (28,2), 408 (36,8), 517 (55,5) y 164 (25) para los grupos Ctrl, TSA, TubA y NaB, respectivamente, en extractos HT. Estas diferencias resultaron significativas (**Figura 12-C**; ANOVA: $F_{(3, 21)} = 16{,}372$; $p < 0{,}0001$). Los grupos TSA y

TubA mostraron mayores niveles de α-tubulina acetilada respecto al grupo control y al grupo NaB y sin diferencias estadísticas entre sí (Ctrl - TSA: p = 0,0046. Ctrl - TubA: p < 0,0001. TSA - NaB: p = 0,0282. TubA - NaB: p = 0,0002. TSA - TubA: p = 0,4095). El grupo NaB mantuvo niveles de acetilación similares al Ctrl (Ctrl - NaB: p = 0,8496). En los extractos eDPS también se observaron variaciones significativas de acetil-α-tubulina (**Figura 12-D**; ANOVA: $F_{(3, 17)}$ = 12,102; p = 0,0002). Los valores medios (± error estándar) fueron 100 (14,6), 157 (9,4), 185 (7,7) y 119 (12,7) para los grupos Ctrl, TSA, TubA y NaB, respectivamente. Los niveles de acetil-α-tubulina del grupo NaB fueron similares al del grupo control (Ctrl - NaB: p = 0,6347) y significativamente menores al del grupo TubA (TubA - NaB: p = 0,0028). Los grupos TSA y TubA exhibieron mayor acetilación de α-tubulina que el grupo Ctrl (Ctrl - TSA: p = 0,01171. Ctrl - TubA: p = 0,0002). Finalmente, el grupo TSA no mostró diferencias estadísticas significativas con los grupos TubA y NaB (TSA - TubA: p = 0,3162. TSA - NaB: p = 0,1236). Los resultados en este párrafo expuesto muestran que tanto la TSA como la TubA son capaces de preservar la acetilación de α-tubulina (K40) en los extractos estudiados mas no así el NaB. Esto se condice con el hecho de que NaB inhibe KDACs que son principalmente nucleares y tanto TSA como TubA inhiben KDAC6.

En conjunto, los resultados de la **Figura 12** muestran que solo los inhibidores de la clase IIb de la familia de deacetilasas (TSA y TubA), clase a la que pertenece KDAC6, son capaces de preservar la acetilación de tubulina tanto en homogenatos totales como en extracto enriquecidos en densidades posinápticas. Esto sugiere que KDAC6 es responsable, al menos en gran parte, del efecto observado sobre la preservación de la acetilación en estos extractos.

A continuación, estudiamos la capacidad de la TubA de inhibir enzimas deacetilasas *in vivo* de forma indirecta, midiendo los niveles de acetilación de tubulina en extractos de proteínas hipocampales de ratones inyectados con TubA o vehículo de forma intraperitoneal (**Figura 13**).

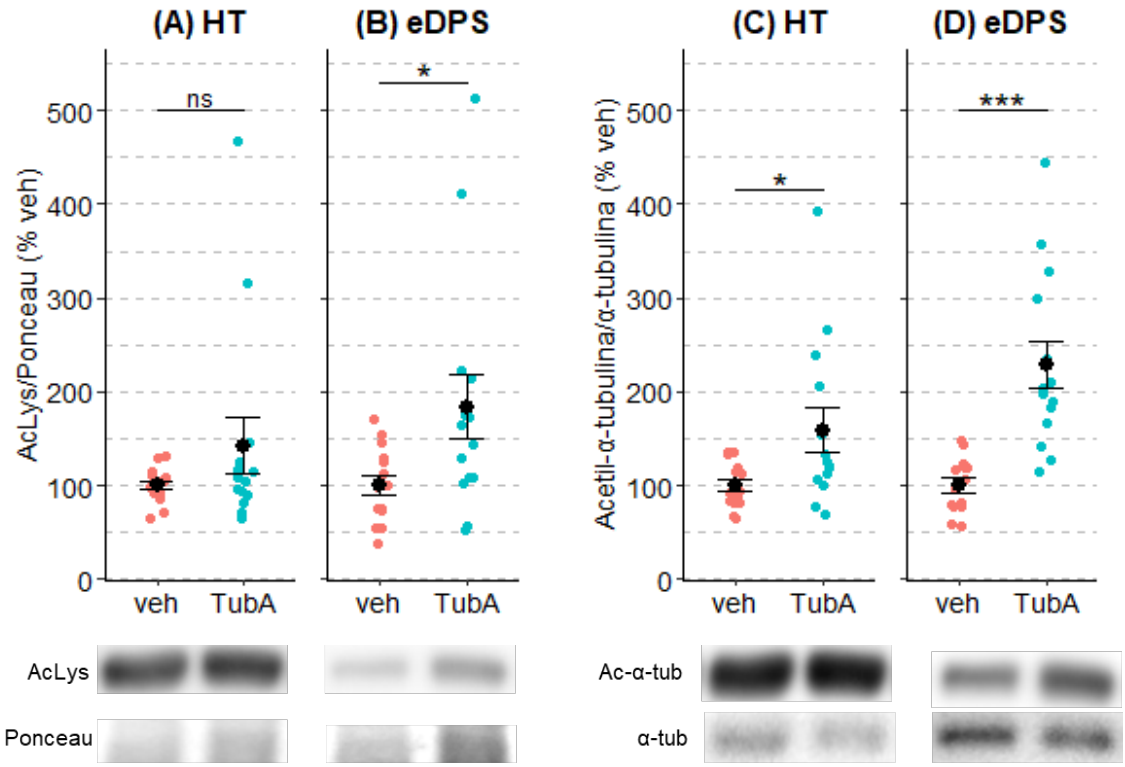


Figura 13: La TubA administrada de forma intraperitoneal es capaz de modular los niveles de acetilación de tubulina

Se administró TubA o vehículo a ratones *naïve* y luego se midieron los niveles de acetilación en extractos de proteínas hipocampales. **(A)** Niveles de AcLys en homogenatos totales y **(B)** en extractos enriquecidos en densidades posinápticas. **(C)** Niveles de acetil-α-tubulina en homogenatos totales y **(D)** en extractos enriquecidos en densidades posinápticas. Con puntos negros y líneas horizontales se muestran la media ± error estándar por grupo, respectivamente. Los datos se presentan relativizados a la media del grupo veh. Debajo de cada gráfico se muestran bandas representativas de AcLys, Ponceau, acetil-α-tubulina y α-tubulina. (*) $p < 0,05$; (***) $p < 0,001$; prueba t de Student o de Welch. n= veh: 14, TubA: 14.

La administración IP de TubA, por un lado, no modificó los niveles de AcLys en extractos totales (Media ± error estándar: veh, 100 ± 5,1; TubA, 142 ± 29,8. Prueba t de Student: $t_{(26)} = -1,399$; $p = 0,1737$) pero sí causó un aumento en los extractos enriquecidos en densidades posinápticas de los mismos animales respecto del grupo control (Media ± error estándar: veh, 100 ± 11; TubA, 184 ± 34,8. Prueba t de Student: $t_{(26)} = -2,296$; $p = 0,03$). Por otro lado, los niveles de α-tubulina acetilada del grupo TubA aumentaron significativamente respecto del control tanto en los homogenatos totales (Media ± error estándar: veh, 100 ± 6,6; TubA, 159 ± 23,8. Prueba t de Student: $t_{(26)} = -2,381$; $p = 0,0249$) como en los enriquecidos en densidades posinápticas (Media ± error estándar: veh, 100 ± 7,9; TubA, 228 ± 25,5. Prueba t de Welch: $t_{(15,5)} = -4,81$; $p = 0,0002$).

Estos resultados indican que la TubA es capaz de inhibir rápidamente a KDAC6 en el cerebro tras una inyección sistémica y que la enzima mencionada es un fuerte modulador del estado de acetilación de tubulina, incluso en la sinapsis.

3.3.2 Estudios bioquímicos durante la consolidación de la memoria

En esta sección de trabajo abordamos el estudio de los cambios bioquímicos inducidos por el aprendizaje, tanto a 15 como a 45 minutos posteriores a la adquisición. Evaluamos, en extractos de proteínas hipocampales, los niveles de acetilación de tubulina (AcLys y acetil-α-tubulina) y de la histona 3; también los niveles y el *clustering* de PSD95.

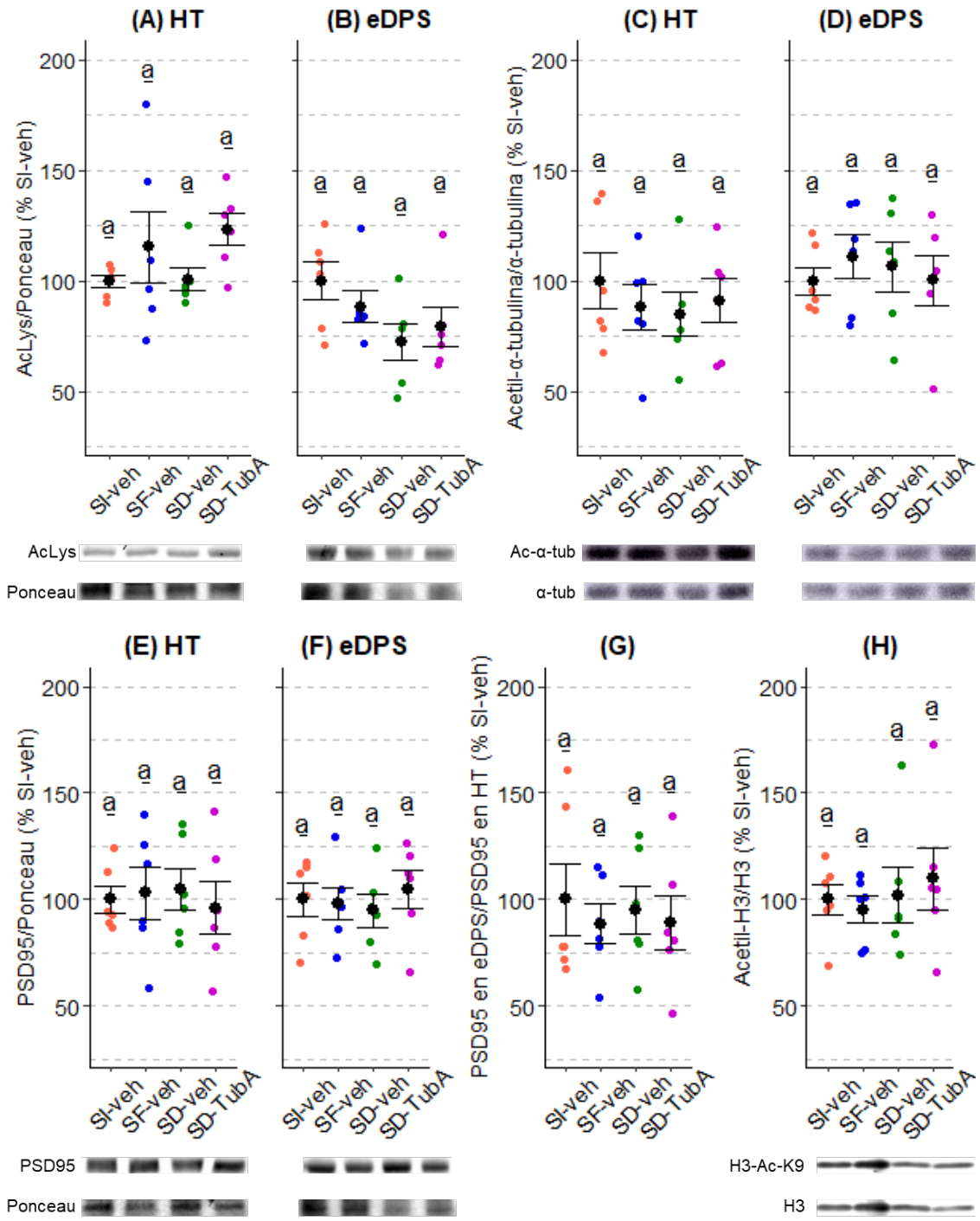


Figura 14: Niveles de tubulina acetilada, histona acetilada y PSD95, 15 minutos después del entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria

Se entrenaron ratones en EI, inmediatamente después se les administró veh o TubA y 15 minutos más tarde se realizaron extractos de proteínas hipocampales. **(A)** Niveles de AcLys en homogenatos totales y **(B)** en extractos enriquecidos en densidades posinápticas. **(C)** Niveles de acetil-α-tubulina en homogenatos totales y **(D)** en extractos enriquecidos en densidades posinápticas. **(E)** Niveles de AcLys en homogenatos totales y **(F)** en extractos enriquecidos en densidades posinápticas. **(G)** Medida del *clustering* de PSD95. **(H)** Niveles de histona 3 acetilada. Con puntos negros y líneas horizontales se muestran la media ± error estándar por grupo, respectivamente. Los datos se presentan relativizados a la media del grupo SI-veh. Las letras distintas indican diferencias estadísticas significativas entre los grupos mediante la prueba de Tukey. Debajo de cada gráfico se muestran bandas representativas de AcLys, Ponceau, acetil-α-tubulina, α-tubulina, PSD95, acetil-H3 y H3. n= 6 por grupo.

En la evaluación a 15 minutos, ninguna de las variables estudiadas mostró diferencias significativas entre las medias de los grupos (**Figura 14**; ANOVA: AcLys en HT, $F_{(3, 20)} = 1{,}492$; $p = 0{,}2471$. AcLys en eDPS, $F_{(3, 20)} = 2{,}122$; $p = 0{,}1295$. Acetil-α-tubulina en HT, $F_{(3, 20)} = 0{,}365$; $p = 0{,}7793$. Acetil-α-tubulina en eDPS, $F_{(3, 20)} = 0{,}299$; $p = 0{,}8259$. PSD95 en HT, $F_{(3, 20)} = 0{,}133$; $p = 0{,}939$. PSD95 en eDPS, $F_{(3, 20)} = 0{,}269$; $p = 0{,}8469$. *Clustering* de PSD95, $F_{(3, 20)} = 0{,}269$; $p = 0{,}8469$. Acetil-H3, $F_{(3, 20)} = 0{,}312$; $p = 0{,}8166$).

Resultados similares se observaron a 45 minutos, donde ni el entrenamiento ni la administración de TubA indujeron cambios significativos en los parámetros evaluados (**Figura 15**; ANOVA: AcLys en HT, $F_{(3, 35)} = 0{,}424$; $p = 0{,}7367$. AcLys en eDPS, $F_{(3, 34)} = 2{,}763$; $p = 0{,}057$. Acetil-α-tubulina en HT, $F_{(3, 19)} = 0{,}367$; $p = 0{,}7776$. Acetil-α-tubulina en eDPS, $F_{(3, 34)} = 1{,}472$; $p = 0{,}2394$. PSD95 en HT, $F_{(3, 35)} = 0{,}52$; $p = 0{,}6715$. *Clustering* de PSD95, $F_{(3, 34)} = 0{,}15$; $p = 0{,}9291$. Acetil-H3, $F_{(3, 36)} = 0{,}208$; $p = 0{,}8906$. Para el caso de PSD95 en eDPS se empleó la prueba de Wald dado que el modelo era lineal mixto, $\chi^2_{(3)} = 0{,}198$; $p = 0{,}9779$).

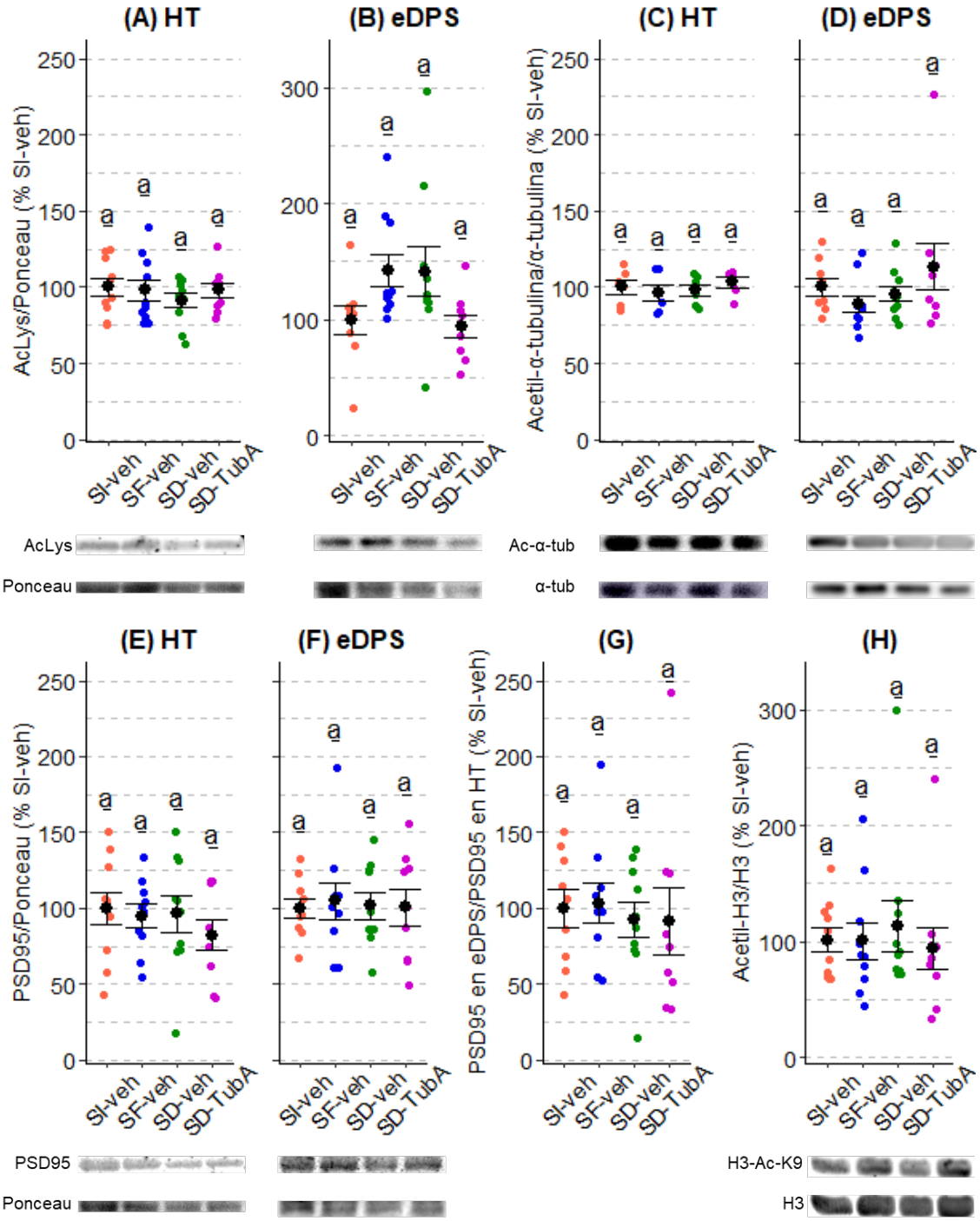


Figura 15: Niveles de tubulina acetilada, histona acetilada y PSD95, 45 minutos después del entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria

Se entrenaron ratones en EI, inmediatamente después se les administró veh o TubA y 45 minutos más tarde se realizaron extractos de proteínas hipocampales. **(A)** Niveles de AcLys en homogenatos totales y **(B)** en extractos enriquecidos en densidades posinápticas. **(C)** Niveles de acetil-α-tubulina en homogenatos totales y **(D)** en extractos enriquecidos en densidades posinápticas. **(E)** Niveles de AcLys en homogenatos totales y **(F)** en extractos enriquecidos en densidades posinápticas. **(G)** Medida del *clustering* de PSD95. **(H)** Niveles de histona 3 acetilada. Con puntos negros y líneas horizontales se muestran la media ± error estándar por grupo, respectivamente. Los datos se presentan relativizados a la media del grupo SI-veh. Las letras distintas indican diferencias estadísticas significativas entre los grupos mediante la prueba de Tukey. Debajo de cada gráfico se muestran bandas representativas de AcLys, Ponceau, acetil-α-tubulina, α-tubulina, PSD95, acetil-

H3 y H3. n= SI-veh: 9-10, SF-veh: 10, SD-veh: 10, SD-TubA: 9-10. Para acetil-α-tubulina de HT, n= SI-veh: 6, SF-veh: 6, SD-veh: 6, SD-TubA: 5.

Los valores medios (± error estándar) para los niveles de AcLys en eDPS variaron entre 100 (12,4), 142 (14,4), 142 (21,9) y 94 (9,5) para los grupos SI-veh, SF-veh, SD-veh y SD-TubA, respectivamente. Como se indicó en el párrafo anterior, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, pero muestran una tendencia (p = 0,057). Como se puede notar visualmente, esta tendencia responde a que las medias de los grupos SF-veh y SD-veh son mayores que la de los grupos SI-veh y SD-TubA; una prueba *post hoc* de Tukey corrobora esa observación (SI-veh - SF-veh: p = 0,2441. SI-veh - SD-veh: p = 0,2595. SI-veh - SD-TubA: p = 0,9931. SF-veh - SD-veh: p = 0,9999. SF-veh - SD-TubA: p = 0,1486. SD-veh - SD-TubA: p = 0,1593). Dadas estas observaciones nos preguntamos si la elección del grupo control (SI-veh) pudiera estar enmascarando algún cambio en los niveles de AcLys. Entonces, llevamos a cabo un experimento donde evaluamos los niveles de acetilación 45 minutos luego de la adquisición en extractos eDPS de animales entrenados en la tarea de EI con un shock fuerte, usando animales *naïve* como grupo control (**Figura 16**).

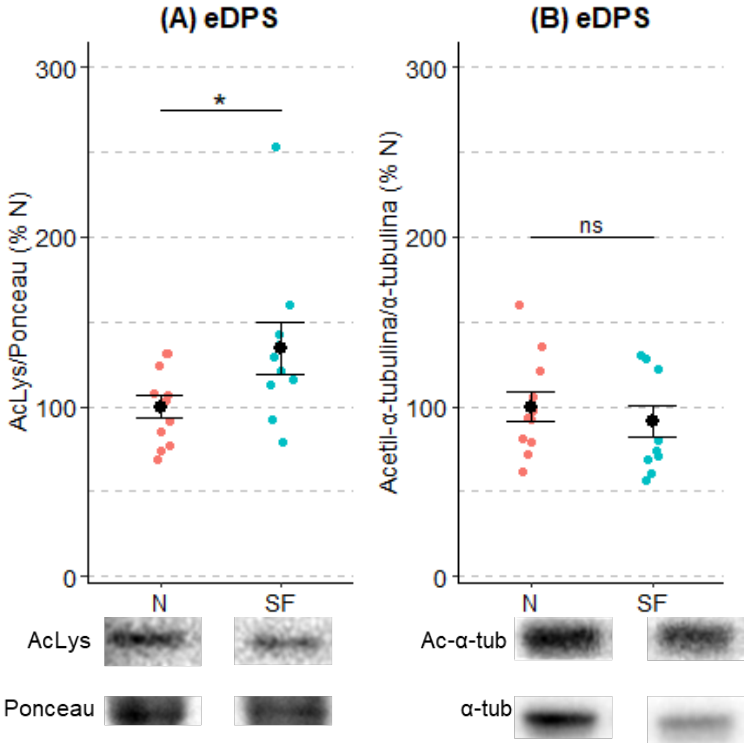


Figura 16: El entrenamiento fuerte de EI induce, a los 45 minutos, un aumento en los niveles de AcLys, pero no de acetil-α-tubulina

Ratones CF1 fueron entrenados en la tarea de EI y 45 minutos después se midieron los niveles de acetilación en extractos eDPS hipocampales; animales *naïve* se usaron como control. **(A)** Niveles de AcLys y **(B)** de acetil-α-tubulina. Con puntos negros y líneas horizontales se muestran la media ± error estándar por grupo, respectivamente. Los datos se presentan relativizados a la media del

grupo N. Debajo de cada gráfico se muestran bandas representativas de AcLys, Ponceau, acetil-α-tubulina y α-tubulina. (*) p < 0,05; prueba t de Student. n= N: 11, SF 10.

Los niveles medios (± error estándar) de AcLys fueron 100 (6,9) para el grupo N y 134 (15,2) para SF; estas diferencias resultaron significativas (Prueba t de Student: $t_{(19)} = -2{,}12$; $p = 0{,}0474$). En cambio, los niveles medios de acetil-α-tubulina no mostraron diferencias estadísticas significativas (Prueba t de Student: $t_{(19)} = 0{,}665$; $p = 0{,}5139$), variando entre 100 (8,8) y 91 (9,6), N y SF respectivamente. Esto muestra que un protocolo fuerte de entrenamiento en la tarea de EI aumenta los niveles de AcLys pero no de acetil-α-tubulina cuando se lo compara con animales *naïve.*

3.4 Discusión

Los resultados presentados en este capítulo muestran, en primer lugar, que el anticuerpo contra AcLys (CST-9441S) reconoce tubulina acetilada. En segundo lugar, que la inhibición de KDAC6 únicamente (con TubA) o de todas las KDACs de clase I y II (con TSA) preserva la acetilación de tubulina tanto en extractos totales como enriquecidos en densidades posinápticas de hipocampo de ratón, pero no lo hace el inhibidor de KDACs clase I y IIa, sodio butirato. En tercer lugar, ni el protocolo fuerte ni el débil de EI indujeron cambios en la acetilación de tubulina, de histona 3 ni en los niveles y *clustering* de PSD95, a 15 y 45 minutos luego de la adquisición. Tampoco se observaron cambios en los animales con entrenamiento débil a los cuales se les administro TubA intraperitoneal inmediatamente después del entrenamiento. Estas observaciones se realizaron comparando a los animales contra un grupo SI, el cual no aprende la asociación de la tarea de EI aun cuando si recibe el estímulo aversivo. Finalmente, cuando se compara los niveles de AcLys de animales entrenados en EI con el estímulo fuerte contra animales *naïve* , que no tuvieron contacto con el dispositivo experimental ni recibieron shock eléctrico, se observa un aumento significativo en los animales entrenados. Sorprendentemente, en los mismos animales, los niveles de acetil-α-tubulina no difieren entre animales entrenados y *naïve*. Dado que el anticuerpo anti-AcLys no reconoce los mismos sitios acetilados de α-tubulina que el anticuerpo anti-acetil-α-tubulina, el cual reconoce la lisina en la posición 40 de la proteína (K40), esto sugiere que parte del aumento en acetilación que se encuentra es de otros sitios de acetilación sobre tubulina distintos de K40. Este resultado coincide con reportes en que otras acetilaciones sobre α-tubulina son las más abundantes en el cerebro del ratón (N. Liu et al., 2015) y trabajos en que la morfogénesis de la sinapsis depende de la acetilación de K394 de α-tubulina (Saunders et al., 2022).

Cabe destacar de la inhibición *in vitro* de KDACs que, en los extractos totales, tanto la TSA como la TubA fueron igualmente eficientes en preservar la acetilación

medida con AcLys y acetil-α-tubulina (**Figura 12**). Diferente fue la situación en los extractos eDPS, donde la TSA no logra un efecto estadístico respecto del control en la acetilación medida con AcLys, pero si lo logra en la acetilación de K40. Esto sugiere que la medida de efectividad de los inhibidores para preservar la acetilación de tubulina depende del extracto analizado y el anticuerpo empleado. Se sabe que KDAC6 es la principal deacetilasa de K40, por lo que es esperable una igual eficiencia en la preservación de la acetilación de ese residuo con TSA y TubA. Sin embargo, cuando observamos la acetilación mediante AcLys no tenemos certeza de cuál o cuáles son las lisinas acetiladas que observamos. Podemos suponer que AcLys reconoce o (1) K40 y otra u otras lisinas de α- y/o β-tubulina o (2) una o más lisinas de α- y/o β-tubulina excepto K40. Si bien KDAC6 regula la acetilación de K40, K60, K370 y K394 en α-tubulina y K58, K103 y K154 en β-tubulina, se desconoce su actividad sobre K112, K124 y K352 en α-tubulina y K216 en β-tubulina y no tiene actividad deacetilasa sobre K174 de β-tubulina (N. Liu et al., 2015). Además, un trabajo reciente *in vivo* reportó que las acetilaciones de α-tubulina en el hipocampo de ratón observadas eran K163, K311, K394 y K401 pero no se detectó K40 (F. Liu et al., 2024), sugiriendo que en esta área la relevancia de las acetilaciones podría ser distinta a la reportadas en otras áreas, en cultivo e *in vitro*. El resultado de lo observado en los extractos eDPS tratados con TSA medido con AcLys es sin duda el resultado de la actividad de KDAC6, pero no podemos descartar el efecto aditivo de la actividad de alguna otra enzima con actividad KDAC o la medición de residuos no regulados por KDAC6.

Observaciones similares se pueden hacer al evaluar la acetilación de tubulina tras la administración IP de TubA en animales *naïve* (**Figura 13**). En extractos totales, la TubA induce un aumento significativo en K40 pero no en AcLys; en cambio, en extractos eDPS, tanto K40 como AcLys tienen valores medios superiores a sus controles. Sin embargo, la magnitud del cambio inducida por la inhibición de KDAC6 sobre de K40 es más grande que la observada en AcLys. Estos resultados son concordantes con la explicación de que el anticuerpo anti-AcLys reconoce otros sitios distintos o adicionales a K40, sitios que no son regulados por KDAC6.

Teniendo en cuenta las diferencias entre AcLys y K40 observadas tras la inhibición de KDACs *in vitro* e *in vivo*, los resultados expuestos en la **Figura 16** se vuelven reveladores. Que el entrenamiento de shock fuerte en la tarea de evitación inhibitoria induzca un aumento en los niveles de AcLys pero no de K40 en los extractos eDPS sugiere una regulación diferencial de los distintos sitios de AcLys en la sinapsis durante la consolidación de la memoria. En principio, la acetilación de K40 no sería regulada durante la consolidación de la tarea de evitación inhibitoria, al menos 45

minutos luego del entrenamiento. Esto no implica que la actividad de KDAC6 no sea relevante durante la consolidación porque como hemos demostrado en el capítulo anterior, su inhibición facilita la consolidación de la memoria de largo término. Dado que desconocemos los sitios reconocidos por AcLys no podemos profundizar en la participación de los distintos sitios en la consolidación de la memoria estudiada. Sin embargo, sí sabemos que precipitando extractos sinaptosomales de hipocampo de ratón con anticuerpo anti-AcLys se obtiene tanto α- como β-tubulina (datos preliminares). En extractos totales en ratas se encontró que la tarea de reconocimiento de objeto novedoso inducía un aumento en la acetilación de K40 en el hipocampo 1 hora después del entrenamiento (Pandey & Sharma, 2020).

La elección de tratamientos control en la experimentación científica es de vital importancia, ya que las observaciones se realizan en función de lo observado en tales tratamientos. En los estudios de memoria usando la tarea de evitación inhibitoria se emplean como controles tratamientos “unshock”, animales que no reciben el estímulo aversivo, tratamientos de shock inmediato, donde el estímulo aversivo es administrado pero el tiempo de exposición al dispositivo experimental es tan corto que no genera una asociación de largo término entre el estímulo y el dispositivo, y ausencia total de tratamiento o *naïve*. Los tratamientos “unshock” no resultan en un buen grupo control ya que, al escapar de un ambiente iluminado e ingresar a uno oscuro y resguardado, los animales reciben un refuerzo positivo que se traduce en un aprendizaje de largo término de preferencia por el interior del dispositivo experimental (Salles et al., 2017). Por el contrario, los tratamientos de shock inmediato resultan un control excelente, ya que, al igual que los grupos experimentales, reciben el shock eléctrico pero sin el componente asociativo de la tarea (Fanselow, Michael S., 1990; Wiltgen et al., 2001). En este trabajo encontramos que ni la tarea de evitación inhibitoria con shock fuerte o shock débil ni la administración de TubA inmediatamente después de un entrenamiento de shock débil alteraron los niveles de AcLys, acetil-α-tubulina (K40), acetil-H3, PSD95 ni el *clustering* de PSD95, tanto en extractos totales como en eDPS, ni a 15 ni a 45 minutos luego del entrenamiento, cuando fueron comparados con tratamientos de shock inmediato (SI). En un trabajo previo del laboratorio se encontró que el entrenamiento de shock fuerte de EI causaba, a los 15 minutos del entrenamiento, una disminución de AcLys en extractos eDPS y, a los 45 minutos, un aumento de AcLys en extractos eDPS, un aumento del *clustering* de PSD95 y una disminución de acetil-H3, cuando era comparados contra un grupo *naïve* (Esquivel, 2017). Como los resultados expuestos en las **Figura 14** y **Figura 15** no concordaban con los previos del laboratorio, decidimos entrenar con un shock fuerte a un grupo de animales teniendo como control a animales

naïve y medir su acetilación tanto por AcLys como por K40. Como se expuso en la **Figura 13**, el entrenamiento indujo un aumento de AcLys, replicando el resultado de Esquivel (2017), pero no un aumento en los niveles de K40. La discrepancia entre lo que observamos al estudiar la acetilación en animales entrenados con y sin inyección de TubA podrían explicarse, en principio, de tres formas diferentes. Por un lado, que el tratamiento SI induzca cambios en los parámetros estudiados (acetilación y *clustering* de PSD95). En tal caso se le podría atribuir parte de ese efecto al estímulo aversivo en sí, que es algo compartido por todos los tratamientos. Así, el grupo *naïve* sería un mejor reflejo de los valores bioquímicos basales estudiados. Por otro lado, que la inyección intraperitoneal en sí misma cause algún efecto que enmascara los cambios inducidos por el aprendizaje. Esta última opción parece la menos probable. Finalmente, que la administración de TubA interactúa con el entrenamiento causando un corrimiento de la dinámica temporal de los parámetros bioquímicos. Observar (1) un aumento en AcLys y K40 en eDPS 45 minutos después de la administración de TubA y (2) un aumento en AcLys pero no K40 en eDPS 45 minutos después del entrenamiento de EI nos llevó a considerar que una interacción entre el entrenamiento y la inhibición de KDAC6 por TubA pueda ser posible.

Capítulo 4: Cambios en la acetilación y composición sináptica inducidos por LTP *in vitro*

4.1 Introducción

4.1.1 Potenciación de largo término

Ramón y Cajal, pionero en la investigación del sistema nervioso, propuso que el almacenamiento de información depende de cambios en la fuerza de las conexiones sinápticas entre neuronas. Luego, en 1973, Bliss y Lømo describieron un aumento en la eficacia de la transmisión sináptica en las células granulares del giro dentado del hipocampo del conejo tras aplicar un tren de estimulación a alta frecuencia en la vía perforante. Esta respuesta incrementada y sostenida se conoció como potenciación de largo término (LTP, por sus siglas en inglés) y rápidamente se reconoció que los cambios sinápticos observados tras la inducción de la LTP eran similares a aquellos descriptos en algunas formas de aprendizaje y memoria (Lynch, 2004).

Al presente, hay un cuerpo sólido de evidencia científica en favor de la LTP como mecanismo subyacente a la formación de algunos tipos de memoria. De forma resumida, podemos mencionar que la LTP es fácilmente inducida en el hipocampo, un área del cerebro importante en la formación de memorias; también que las oscilaciones theta que se observan en el hipocampo de un animal durante la exploración son similares a las ráfagas rítmicas capaces de inducir LTP. Además, fármacos inhibidores de LTP en cultivos de hipocampo también inhiben el aprendizaje y ciertos cambios bioquímicos que ocurren durante la consolidación de memorias también son observados en la inducción de la LTP (Lynch, 2004). Otro paralelo interesante es que así como la formación de memorias tiene un componente de corto término, independiente de síntesis proteica, y uno de largo término, dependiente de expresión génica y síntesis proteica, así también la LTP presenta una fase temprana independiente de síntesis proteica y una fase tardía que sí depende de síntesis de nuevas proteínas (Alkon et al., 2005; Scharf et al., 2002).

El ingreso de iones de calcio a la célula posináptica es uno de los eventos claves en la inducción de la LTP y, en la gran mayoría de casos, es mediado por la activación de los receptores de NMDA. Estos receptores son activados por la acción conjunta del glutamato y la despolarización de la membrana plasmática, comportándose como un detector de coincidencias. Estas formas de LTP dependen de la actividad de receptores de glutamato tipo NMDA, sin embargo existen formas de LTP independientes de dicho receptor (Alkadhi, 2021; Lynch, 2004).

4.1.2 LTP, acetilación y composición sináptica

Las modificaciones postraduccionales de proteínas son eventos claves en la regulación de procesos celulares, como así también en fenómenos de plasticidad sináptica y memoria. La inducción de la LTP está acompañada por cambios en los niveles de acetilación de distintas proteínas. Tanto el butirato de sodio como la tricostatina A, ambos inhibidores de KDACs, tiene efectos facilitadores de la memoria y de la inducción de la LTP por mecanismos dependientes de la acetilación de histonas (Federman et al., 2013; Levenson et al., 2004). Estos efectos están asociados a la regulación de la transcripción génica, ya que la acetilación de histonas reduce su afinidad por el ADN, permitiendo la interacción de este último con la maquinaria transcripcional. También se encontró que la aplicación de butirato de sodio en un protocolo masivo de LTP es capaz de potenciarlo (Pandey et al., 2015). Los mismos autores reportaron algunos años después que el tratamiento con KCl o NMDA, capaces de inducir LTP, sobre rodajas de hipocampo de rata producían un aumento en los niveles de acetilación de α-tubulina; de igual manera, el entrenamiento en la tarea de reconocimiento de objeto novedoso inducía aumentos los niveles de α-tubulina acetilada en extractos de hipocampo, una hora después de la adquisición (Pandey & Sharma, 2020). Como vimos en el capítulo anterior, la acetilación de tubulina se asocia con mayor resistencia a la presión mecánica, mayor estabilidad y altera su interacción con otras proteínas. También se ha reportado que la LTP induce el ingreso de MT a las espinas dendríticas en cultivos de hipocampo de ratón (Merriam et al., 2013; Schätzle et al., 2018) y la actividad dinámica de los MT regula la morfología de las espinas dendríticas y la plasticidad sináptica en cultivos de hipocampo de rata (Jaworski et al., 2009). Esto muestra que la actividad de los MT es regulada por la LTP en las espinas dendríticas.

La proteína de la densidad posináptica, PSD95, participa de distintas maneras de la potenciación de largo término y de los cambios asociados a la misma. Ya mencionamos previamente que niveles apropiados de PSD95 son necesarios para la estabilización de las sinapsis en fases iniciales de la LTP y que PSD95 controla la externalización de receptores de glutamato tipo AMPA durante la potenciación (Ehrlich et al., 2007; Ehrlich & Malinow, 2004). Ratones mutantes para PSD95 muestran una LTP aumentada pero el aprendizaje impedido (Migaud et al., 1998) y, en ensayos *in vitro*, se observa un aumento del 40% en la densidad de espinas dendríticas en el hipocampo sin otras alteraciones en la estructura neuronal. También se reportaron alteraciones de otras proteínas que forman un complejo con el receptor de NMDA, sugiriendo que PSD95 regula la estructura neuronal (Vickers et al., 2006). Se ha reportado un rol importante de PSD95 en la estabilidad de las espinas dendríticas al

estudiar la dinámica temporal de las mismas expresando una proteína recombinante de PSD95 asociada a la proteína fluorescente verde. Los investigadores bservaron que un bajo porcentaje de las espinas recién formadas adquirían PSD95, y aquellas que no lo hacían no duraban más de un día antes de ser podadas. También encontraron que la presencia de PSD95 se asociaba a mayor tiempo de vida de las espinas y que aquellas que iban a ser podadas mostraban una reducción en los niveles de PSD95 (Cane et al., 2014). Por otro lado, se ha reportado la participación de PSD95 en la facilitación de otro mecanismo de plasticidad conocido como depresión de largo término (Stein et al., 2003). Estos reportes dan cuenta de que la densidad posináptica en general, y PSD95 en particular, son elementos claves en fenómenos de plasticidad como la LTP.

Las sinapsinas son una familia de proteínas neuronales cuya principal función descripta es la de regular la liberación de neurotransmisores desde los terminales presinápticos, anclando las vesículas sinápticas al citoesqueleto de actina. Estas proteínas son susceptibles de sufrir modificaciones postraduccionales como fosforilación y acetilación, lo cual regula su interacción con otras proteínas (Cesca et al., 2010). Las sinapsinas son capaces de interactuar con los microtúbulos, interacción que se ve alterada por la fosforilación de la sinapsina 1 (Petrucci & Morrow, 1987). Dado su rol en la liberación de neurotransmisores, las sinapsinas tienen un papel claro en la LTP, al menos en su inducción con estímulos tetánicos. El aumento de calcio inducido por la estimulación desencadena la fosforilación dependiente de calcio de la sinapsinas, lo que conlleva a la liberación de las vesículas sinápticas de su anclaje a los filamentos de actina y un consecuente aumento de su disponibilidad para fusionarse con la membrana y liberar su contenido al espacio sináptico (Cesca et al., 2010; J. S. Lee et al., 2008).

4.1.3 Inducción de la LTP *in vitro*

La LTP dependiente de los receptores de NMDA puede ser inducida en cultivos neuronales organotípicos y disociados, pudiendo lograrse eléctrica o químicamente. En el primer caso, se emplean electrodos que estimulan a las neuronas con trenes a alta frecuencia, lo que se conoce como estímulo tetánico. En el segundo caso, pueden emplearse pulsos de glutamato, ionóforos de calcio, forscolina, APV, glicina o KCl. La inducción química de la LTP cuenta con la ventaja de potenciar una alta proporción de las sinapsis en el cultivo. Particularmente, la inducción de la LTP con glicina requiere de un pretratamiento con APV que, cuando es removido, la presencia de glicina facilita la activación de los receptores de NMDA. Este protocolo se realiza en un medio libre de magnesio (Molnár, 2011).

En esta sección del trabajo estudiamos los cambios provocados por una LTP inducida con glicina sobre los niveles de acetilación dendrítica y sináptica, sobre la proteína de la densidad posináptica PSD95, sobre la proteína presináptica sinapsina y sobre la colocalización de AcLys con PSD95 y sinapsina en cultivos primarios de neuronas de hipocampo de ratón.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Animales

Se utilizaron embriones de ratones CF1 y de ratas Wistar de 17 días (Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA). Los experimentos se realizaron de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del *National Institute of Health* de Estados Unidos (publicación NIH nº 80-23/96) y las regulaciones locales. Se hicieron todos los esfuerzos posibles para minimizar el sufrimiento de los animales y reducir el número de animales utilizados.

4.2.2 Cultivos primarios, estimulación e inmunofluorescencia

Los cultivos se realizaron en colaboración con el laboratorio de la Dra. Verónica Báez, en la Facultad de Medicina de la UBA.

Los cultivos de neuronas hipocampales fueron realizados siguiendo el protocolo propuesto por Kaech and Banker (Kaech & Banker, 2006) con modificaciones. Los hipocampos de embriones fueron recolectados y digeridos con tripsina (Sigma, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EEUU). Las células fueron sembradas en cubreobjetos de vidrio (Waldemar Knittel Glasbearbeitungs—GmbH, Alemania) pretratados con poli-L-lisina (Sigma) e incubadas en medio Neurobasal (NB; Invitrogen, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EEUU) suplementado con B27 (Invitrogen) y glutamina (Invitrogen; NB completo). Los cultivos fueron mantenidos en NB completo a 37ºC y 5% CO_2. El medio de cultivo fue reemplazado de a mitades cada tres días.

Al cabo de 18 días de incubación *in vitro* (DIV), las células fueron estimuladas con 200 mM de glicina para inducir una LTP química (LTPq), en un medio libre de magnesio (Cercato et al., 2017; Swanger et al., 2016). Inmediatamente después (0 min) y a 5, 15 y 45 minutos luego de la estimulación, las células fueron fijadas con una solución buffer fosfato-salina (PBS, por sus siglas en inglés; NaCl 0,137 M, KCl 0,0027 M, H_3PO_4 0,01 M, KH_2PO_4 0,0018 M, pH 7,4) con paraformaldehído 4% y sacarosa 4% (Sigma). Algunas células fueron fijadas antes de la estimulación y usadas como controles (Pre).

Para los ensayos de inmunofluorescencia, los cultivos fueron permeabilizados con PBS-Tritón X-100 0,1% y luego bloqueados con suero normal de cabra al 5% en PBS-Tritón X-100 0,05% (PBS-T). Posteriormente, los cubreobjetos fueron incubados con los anticuerpos primarios (anti-AcLys, CST-9441S, dilución 1:400; anti-PSD95, CST-36233, dilución 1:100; anti-sinapsina1, CST-5297, dilución 1:300) por 1 hora a 37°C, lavados con PBS-T y luego incubados con anticuerpo secundario (anti-conejo-Alexa Fluor 647, Abcam Limited, Cambridge, UK, , dilución 1:300; anti-ratón-Alexa Fluor 488, Abcam Limited, , dilución 1:300) por 30 minutos a 37°C. Se realizó un último lavado con PBS-T y se procedió a montar los cubreobjetos usando Mowiol (Reactivo MOWIOL 4-88, Sigma-Aldrich). Las inmunomarcaciones se realizaron de a pares, AcLys y PSD95 por un lado y AcLys y Syn por otro lado.

Las imágenes de las inmunofluorescencias fueron obtenidas utilizando un Microscopio Confocal Olympus FV300 (Olympus CO, Tokio, Japón) y analizadas empleando los softwares SynPAnal (Danielson, E. y Sang, H.L., Wisconsin, EEUU) e ImageJ (ImageJ, NIH, Bethesda, MA, EEUU). Las señales en las imágenes fueron filtradas empleando umbrales mínimos de intensidad para cada señal. Se analizaron entre 10 y 40 neuronas por tratamiento y se realizaron entre dos y cuatro experimentos independientes (réplicas). En la **Figura 17** se muestran ejemplos de inmunofluorescencias para AcLys y PSD95 y para AcLys y Syn; se ejemplifica también cómo se ven los *punctas* o partículas de cada señal, los cuales fueron la unidad de análisis. Las partículas fueron cuantificadas sobre dendritas secundarias.

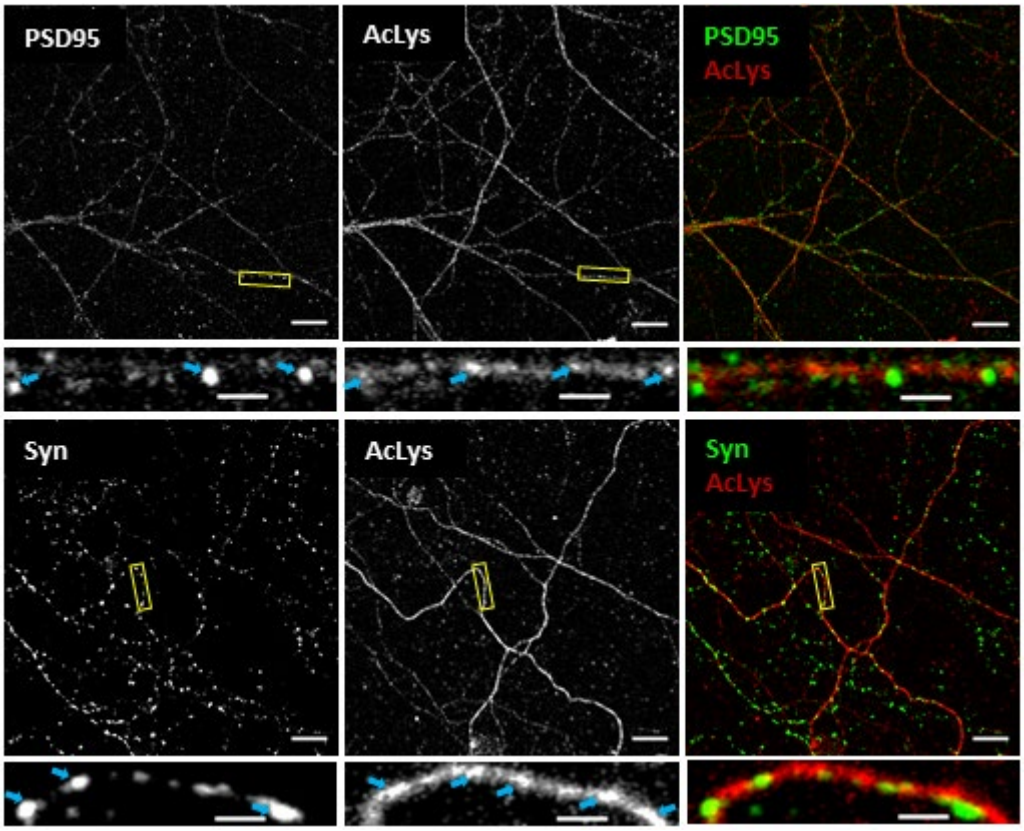


Figura 17: *Punctas* o partículas en inmunofluorescencias
Inmunofluorescencia de cultivo primario de neuronas de hipocampo de ratón mostrando los *punctas* o partículas de AcLys, PSd95 y sinapsina que fueron analizados. Los recuadros amarillos indican las zonas amplificadas de las imágenes. Las flechas muestran ejemplos de los *punctas* o partículas que fueron analizados. A los fines de mostrar las neuronas completas, estas imágenes no están filtradas por umbral de fluorescencia.

4.2.3 Extractos de proteínas de cultivos primarios e inmunodetección

Se obtuvieron extractos totales y enriquecidos en densidades posinápticas a partir de los cultivos de hipocampo, tanto de rata como de ratón, de forma similar a la descripta en la **sección 2.2.5.** Se procesaron cantidades iguales de proteína para cada muestra mediante SDS-PAGE con 10% de acrilamida en el gel de resolución. Luego, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF para inmunotransferencia. La inmunomarcación se realizó con anticuerpos anti-lisina acetilada (AcLys; CST-9441S, dilución 1:1000), anti-α-tubulina (SCBT-23948, dilución 1:7000), anti-α-tubulina acetilada (SCBT-23950, dilución 1:8000), siguiendo los protocolos de los fabricantes. La detección del anticuerpo secundario unido a HRP anti-ratón (CST-7076, dilución 1:10000) o anti-conejo (SCBT-2030, dilución 1:5000) se realizó con el kit Advance ECL como lo describe el fabricante y las señales se capturaron usando Amersham Imager 600. La densidad óptica (OD) se estimó utilizando el software ImageJ 1.53c.

4.2.4 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados empleando modelos lineales generalizados mixtos (GLMM). En todos los casos la variable explicativa de efectos fijos fue el tratamiento (tiempos Pre y 0, 5, 15 y 45 min pos-estímulo).

Para los análisis de las señales de AcLys, PSD95 y Syn se incluyeron dos variables explicativas de efectos aleatorios que dieran cuenta del diseño experimental y de la falta de independencia entre neuronas de una misma réplica: la variable "réplica" (entre dos y cuatro niveles) y la variable "neurona" (entre 10 y 40 niveles). Para el parámetro número de partículas por área dendrítica se utilizó la distribución Tweedie y se incluyeron los valores iguales a cero. Para los parámetros área de partículas e intensidad de fluorescencia por área dendrítica e intensidad de fluorescencia por área de partícula se utilizó una distribución Lognormal y se excluyeron los valores iguales a cero. En todos los casos la función de enlace elegida fue logarítmica.

Para los datos de colocalización, el parámetro número de partículas por área dendrítica se analizó siguiendo la distribución Lognormal para AcLys+PSD+ y Tweedie para AcLys+Syn+, dado que esta última tenía valores iguales a cero que no son soportados por la distribución Lognormal. Para los parámetros área de partículas e intensidad de fluorescencia por área dendrítica e intensidad de fluorescencia por área de partícula se utilizó una distribución Lognormal. En todos los casos la función de enlace elegida fue logarítmica.

El análisis estadístico y las figuras fueron generados usando los softwares R y Rstudio (Posit team, 2023; R Core Team, 2023). Se empleó el paquete glmmTMB para el modelado y Dharma para corroborar los supuestos de los modelos (Brooks et al., 2017; Harting, 2022). Para la prueba de hipótesis de diferencias entre grupos se utilizó el comando `'Anova()'` del paquete car y las comparaciones múltiples se realizaron con la prueba de Tukey sobre las medias marginales estimadas (MME) de los grupos en cada modelo utilizando el paquete emmeans (Lenth, 2023). Los gráficos se realizaron empleando los paquetes ggplot2, gggsignif y patchwork (Ahlmann-Eltze & Patil, 2021; Pedersen, 2024; Wickham, 2016).

4.3 Resultados

La inmunodetección de AcLys, PSD95 y sinapsina (Syn) muestra: para AcLys, señal nuclear y citoplasmática perimétrica y en las dendritas; para PSD95, principalmente señal dendrítica en forma de *punctas* o partículas; para sinapsina, principalmente señal sináptica en forma de *punctas* o partículas. Se estudiaron cuatro parámetros distintos para las señales tanto de AcLys, como de PSD95 y sinapsina, a

saber: número de partículas por área dendrítica, área de partículas por área dendrítica, intensidad de fluorescencia de partículas por área dendrítica e intensidad de fluorescencia de partículas por área de partícula. Se analizaron, en primer lugar, para cada señal por separado y, en segundo lugar, para la colozalización de la señal de AcLys con PSD95, por un lado, y con Syn por otro lado. Esto último corresponde a la acetilación pos y presináptica, respectivamente.

A fin de evaluar si lo detectado en los cultivos con el anticuerpo anti-AcLys coincidía con la banda de tubulina, como se mostró para extractos de hipocampo de ratón, se realizó un ensayo de Western Blot sobre extractos totales (HT) y enriquecidos en densidades posinápticas (eDPS) a partir de un cultivo primario de neuronas hipocampo de rata. Se reveló acetil-α-tubulina (K40), α-tubulina y AcLys y se puede observar en la **Figura 18** que el anticuerpo anti-AcLys detectó en HT una banda principal alrededor de 55 kDa que coincide con la banda de acetil-α-tubulina (K40) y α-tubulina. También se observó una banda de menor peso molecular que podrían ser histonas. En extractos eDPS se observan las mismas bandas. En extractos eDPS de cultivos de neuronas hipocampales de ratón se observa una banda principal en 55 kDa con anti-AcLys.

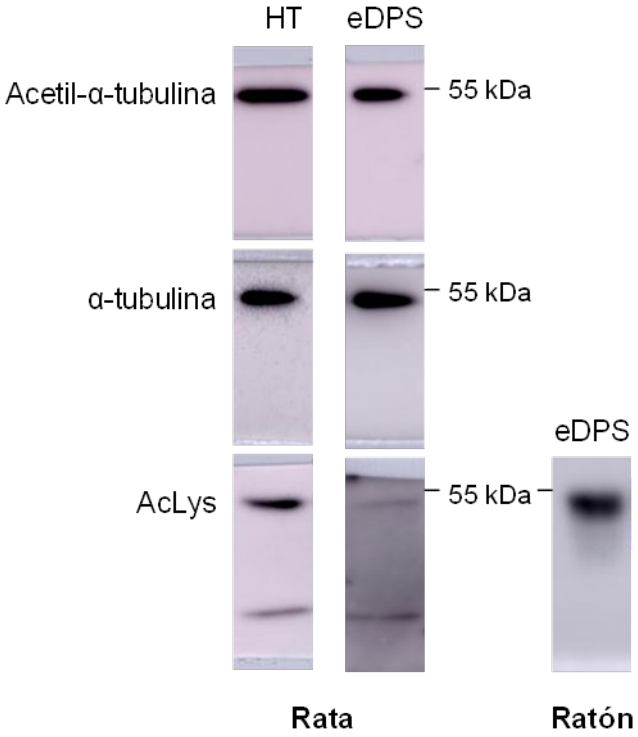


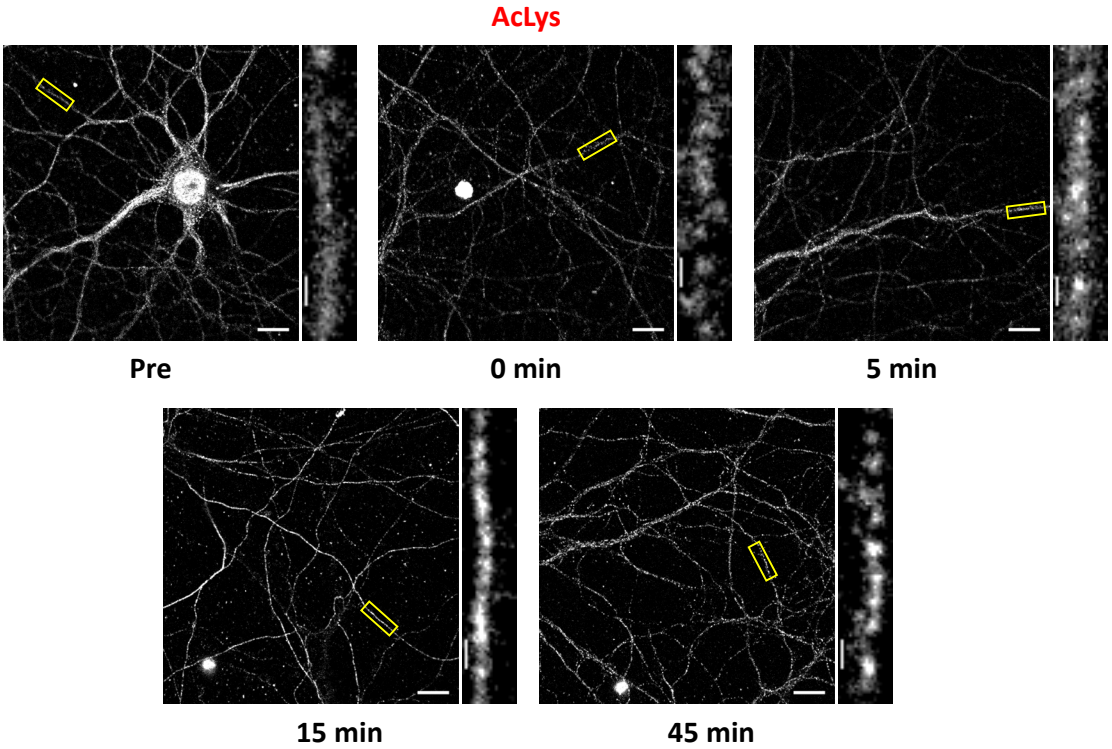
Figura 18: El anticuerpo anti-AcLys detecta una banda alrededor de 55 kDa que coincide con la banda de acetil-α-tubulina (K40) y α-tubulina
Extracto total (HT) y enriquecido en densidades posinápticas (eDPS) de un cultivo primario de neuronas hipocampo de rata (columnas de la izquierda) y extracto eDPS de un cultivo primario de neuronas hipocampo de ratón (columna de la derecha). El anti-AcLys detecta una banda de

alrededor de 55 kDa que coincide con la banda de α-tubulina (total y acetilada) en extractos HT y eDPS de cultivos de hipocampo de rata. En extractos eDPS de cultivos de hipocampo de ratón, anti-AcLys detecta una banda principal alrededor de 55kDa.

4.3.1 Efectos de la LTPq sobre la señal de AcLys

Neuronas hipocampales de 18 DIV fueron sometidas a una LTPq, fijadas previamente al tratamiento (Pre) y a 0, 5, 15 y 45 minutos posteriores al mismo y finalmente inmunomarcadas contra AcLys (**Figura 19-A**).

(A)



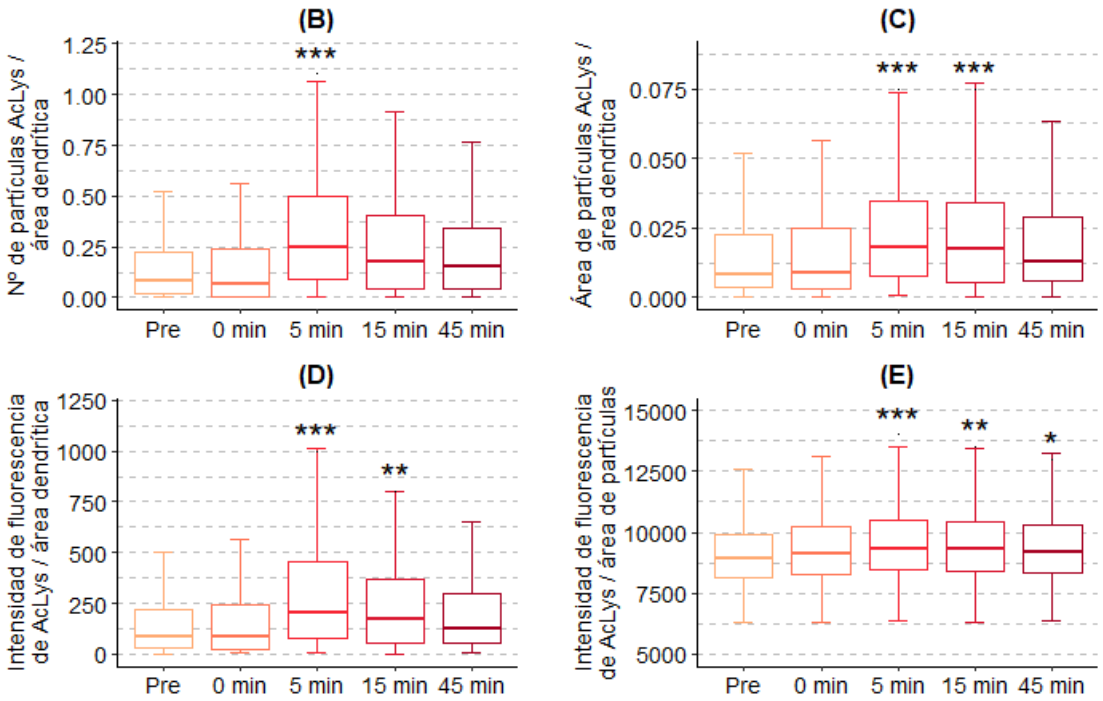


Figura 19: Las neuronas hipocampales sometidas a LTPq muestran un aumento en la señal de acetilación dendrítica

(A) Neuronas hipocampales de 18 DIV fueron sometidas a una LTPq, fijadas previamente al tratamiento (Pre) y a 0, 5, 15 y 45 minutos posteriores al mismo y finalmente inmunomarcadas contra AcLys. El recuadro amarillo indica la ampliación que se muestra a la derecha de cada imagen. Escalas: Izq.: 10 µm, Der.: 1 µm. Se cuantificaron **(B)** la densidad, **(C)** el área y **(D)** la intensidad de fluorescencia de las partículas de AcLys por área dendrítica. También se cuantificó **(E)** la intensidad de fluorescencia de las partículas de AcLys por área de partícula. Los datos por grupo se muestran en gráficos de cajas (mediana y rango intercuartílico) y bigotes (valores mínimos y máximos no atípicos). (*) $p < 0{,}05$; (**) $p < 0{,}01$; (***) $p < 0{,}001$; prueba de Tukey. Los datos corresponden a cuatro experimentos independientes. Número de neuronas = Pre: 40; 0 min: 39; 5 min: 21; 15 min: 39; 45 min: 36.

Las medianas (Q1; Q3) de densidad de AcLys fueron 0,08 (0,02; 0,22), 0,07 (0; 0,26), 0,25 (0,09; 0,5), 0,18 (0,04; 0,41) y 0,15 (0,05; 0,35) partículas por unidad de área dendrítica para los tratamientos Pre, 0 min, 5 min, 15 min y 45 min, respectivamente. Estas variaciones fueron significativas (**Figura 19-B**; Prueba de Wald: $\chi^2_{(4)} = 26{,}066$; $p < 0{,}0001$). La LTPq indujo un aumento estadísticamente significativo en el número de partículas de AcLys por área dendrítica a los 5 minutos, el cual se mantuvo como una tendencia a los 15 minutos, respecto al tiempo Pre (MME: Pre: 0,12; 0 min: 0,11; 5 min: 0,32; 15 min: 0,2; 45 min: 0,17. Prueba de Tukey: Pre vs 0 min, $p = 0{,}9994$; Pre vs 5 min, $p = 0{,}0003$; Pre vs 15 min, $p = 0{,}0705$; Pre vs 45 min, $p = 0{,}4321$). Las medianas (Q1; Q3) de área de partícula de AcLys fueron 0,009 (0,0036; 0,0235), 0,0098 (0,0032; 0,0273), 0,0226 (0,0091; 0,0461), 0,0197 (0,0065; 0,0405) y 0,014 (0,0063; 0,0334) por unidad de área dendrítica para los tratamientos Pre, 0 min, 5 min, 15 min y 45 min, respectivamente. Estas variaciones fueron significativas (**Figura 19-C**; Prueba de Wald: $\chi^2_{(4)} = 23{,}812$; $p < 0{,}0001$) y la prueba de Tukey sobre las medias marginales estimadas

del modelo revelaron un aumento significativo del área de las partículas a 5 y 15 minutos respecto del tiempo Pre; a 45 minutos se observa una tendencia (MME: Pre: 0,021; 0min: 0,022; 5 min: 0,032; 15 min: 0,029; 45 min: 0,027. Pre vs 0 min, p = 0,9825; Pre vs 5 min, p = 0,0012; Pre vs 15 min, p = 0,0065; Pre vs 45 min, p = 0,0648). Las medianas (Q1; Q3) de intensidad de fluorescencia de AcLys por área dendrítica fueron 82,6 (34,2; 225,3), 91,1 (27,2; 256,5), 234,8 (78,8; 518,9), 193 (59,5; 412) y 138,7 (56,8; 332,5) para los tratamientos Pre, 0 min, 5 min, 15 min y 45 min, respectivamente. La prueba del Wald para el GLMM fue significativa (**Figura 19-D**; $\chi^2_{(4)}$ = 26,248; p < 0,0001). La intensidad de fluorescencia a 5 y 15 minutos fue significativamente mayor que en el tiempo Pre, y se mantuvo como tendencia a los 45 min (MME: Pre: 209; 0 min: 220; 5 min: 334; 15 min: 288; 45 min: 269. Prueba de Tukey: Pre vs 0 min, p = 0,9865; Pre vs 5 min, p = 0,0003; Pre vs 15 min, p = 0,0057; Pre vs 45 min, p = 0,0759). Las medianas (Q1; Q3) de intensidad de fluorescencia de las partículas AcLys relativizadas a su propia área fueron 8913 (8146; 9938), 9151 (8300; 10233), 9367 (8467; 10590), 9320 (8425; 10476) y 9240 (8336; 10358) para los tratamientos Pre, 0 min, 5 min, 15 min y 45 min, respectivamente. La prueba de Wald sobre el GLMM fue significativa (**Figura 19-E**; $\chi^2_{(4)}$ = 24,86; p < 0,0001) y la prueba de Tukey reveló un aumento significativo a los 5, 15 y 45 minutos respecto del tiempo Pre (MME: Pre: 9207; 0 min: 9308; 5 min: 9551; 15 min: 9467; 45 min: 9417. Pre vs 0 min, p = 0,6124; Pre vs 5 min, p = 0,0002; Pre vs 15 min, p = 0,0016; Pre vs 45 min, p = 0,0248). Estos resultados indican que la LTPq inducida por un shock de glicina a alta concentración genera cambios en los niveles de acetilación de las dendritas, señalando que la acetilación de proteínas dendríticas está regulada durante este proceso de plasticidad *in vitro*.

4.3.2 Efectos de la LTPq sobre la señal de PSD95

A continuación, se evaluaron los efectos de la LTPq sobre la señal de la proteína de la densidad posináptica PSD95 (**Figura 20-A**).

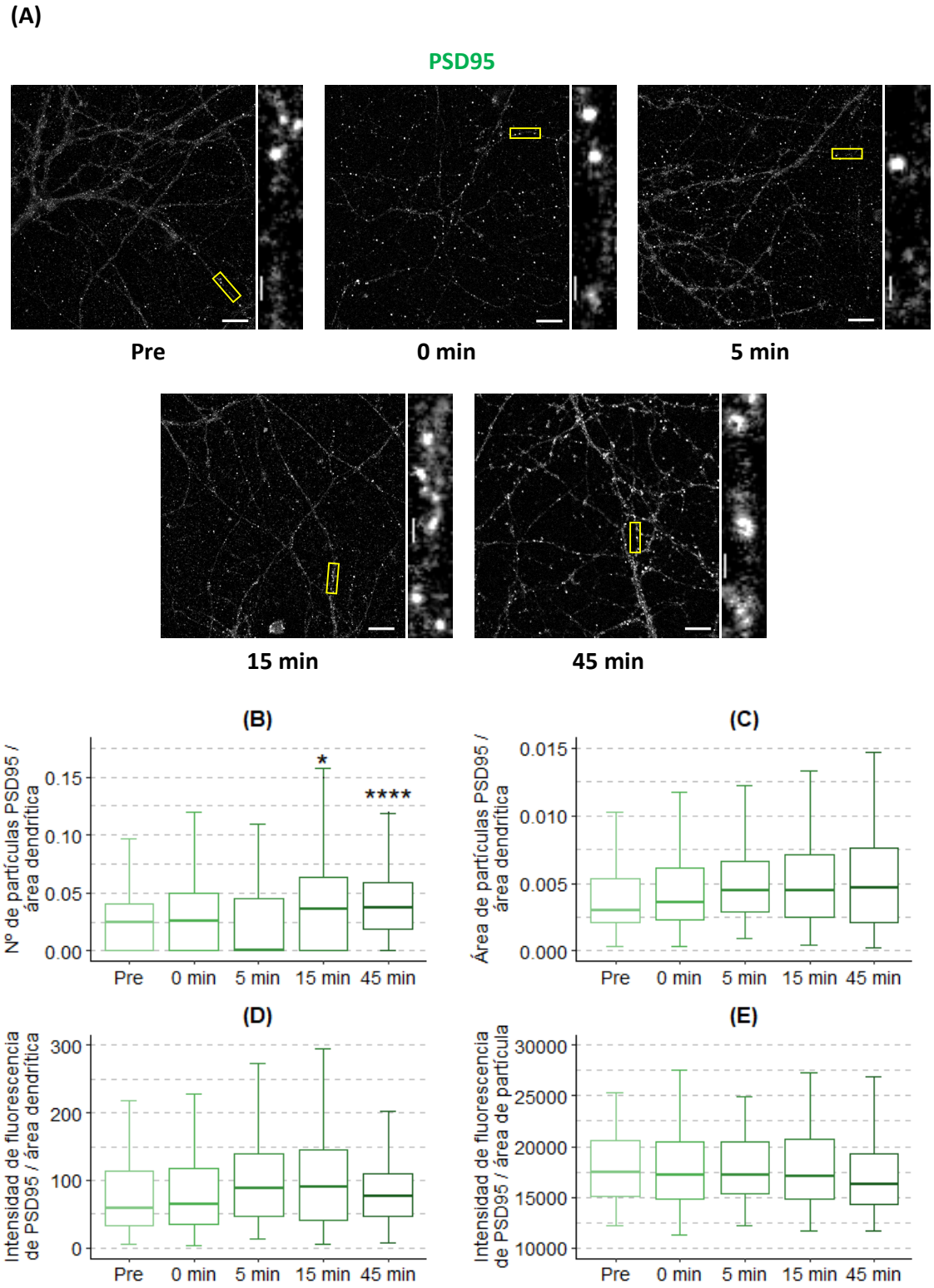


Figura 20: Las neuronas hipocampales sometidas a LTPq muestran un aumento en el número de partículas de PSD95 a 15 y 45 minutos posteriores al estímulo

(A) Neuronas hipocampales de 18 DIV fueron sometidas a una LTPq, fijadas previamente al tratamiento (Pre) y a 0, 5, 15 y 45 minutos posteriores al mismo y finalmente inmunomarcadas contra la proteína de la densidad posináptica PSD95. El recuadro amarillo indica la ampliación que se muestra a la derecha de cada imagen. Escalas: Izq.: 10 µm, Der.: 1 µm. Se cuantificaron **(B)** la densidad, **(C)** el área y **(D)** la intensidad de fluorescencia de las partículas de PSD95 por área dendrítica. También se cuantificó **(E)** la intensidad de fluorescencia de las partículas de PSD95 por

área de partícula. Los datos por grupo se muestran en gráficos de cajas (mediana y rango intercuartílico) y bigotes (valores mínimos y máximos no atípicos). (*) p < 0,05; (****) p < 0,0001; prueba de Tukey. Los datos corresponden a dos experimentos independientes. Número de neuronas = Pre: 20; 0 min: 20; 5 min: 10; 15 min: 20; 45 min: 20.

Las medianas (Q1; Q3) de densidad de PSD95 fueron 0,024 (0; 0,042), 0,026 (0; 0,051), 0 (0; 0,045), 0,036 (0; 0,064) y 0,038 (0,021; 0,064) partículas por unidad de área dendrítica para los tratamientos Pre, 0 min, 5 min, 15 min y 45 min, respectivamente. Estas variaciones fueron significativas (**Figura 20-B**; Prueba de Wald: $\chi^2_{(4)}$ = 30,734; p < 0,0001), mostrando los tiempos 15 y 45 min mayores niveles de densidad de partículas que el tiempo Pre (MME: Pre: 0,027; 0 min: 0,035; 5 min: 0,026; 15 min: 0,041; 45 min: 0,051. Prueba de Tukey: Pre vs 0 min, p = 0,397; Pre vs 5 min, p = 0,9988; Pre vs 15 min, p = 0,0267; Pre vs 45 min, p < 0,0001). Las medianas (Q1; Q3) de área de PSD95 por área dendrítica fueron 0,0031 (0,0022; 0,0056), 0,0037 (0,0023; 0,0066), 0,0046 (0,0031; 0,0079), 0,0047 (0,0025; 0,0077) y 0,0054 (0,0026; 0,0097) para los tratamientos Pre, 0 min, 5 min, 15 min y 45 min, respectivamente. La prueba de Wald obtuvo un p-valor cercano a la significancia estadística (**Figura 20-C**; $\chi^2_{(4)}$ = 9,223; p = 0,0558) y la prueba *post hoc* de Tukey reveló que el área de partículas de PSD95 a 5 minutos tiende a diferenciarse del tiempo Pre (MME: Pre: 0,0053; 0 min: 0,0056; 5 min: 0,0067; 15 min: 0,0062; 45 min: 0,0061. Pre vs 5 min, p = 0,0779). Las medianas (Q1; Q3) de intensidad de fluorescencia de PSD95 relativa al área dendrítica fueron 59,7 (33,2; 118,7), 68,7 (35,1; 127), 94,5 (50,8; 153,9), 94,8 (41,5; 155,2) para los tratamientos Pre, 0 min, 5 min, 15 min y 45 min, respectivamente. La prueba de Wald fue significativa (**Figura 20-D**; Prueba de Wald: $\chi^2_{(4)}$ = 11,008; p = 0,0265) y la prueba *post hoc* de Tukey reveló que el tratamiento a 5 minutos tiende a diferenciarse del tratamiento Pre (MME: Pre: 97,1; 0 min: 100,7; 5 min: 120,8; 15 min: 111,2; 45 min: 113,9. Pre vs 0 min, p = 0,9856; Pre vs 5 min, p = 0,0754; Pre vs 15 min, p = 0,2593; Pre vs 45 min, p = 0,1381). Las medianas (Q1; Q3) de intensidad de fluorescencia de PSD95 relativa al área de cada partícula fueron 80,5 (49,2; 124,4) y 17500 (15059; 20582), 17146 (14865; 20422), 17227 (15381; 20433), 17100 (14870; 20679) y 16213 (14295; 19351) para los tratamientos Pre, 0 min, 5 min, 15 min y 45 min, respectivamente. No se observaron variaciones significativas entre los grupos para este último parámetro (**Figura 20-E**; Prueba de Wald: $\chi^2_{(4)}$ = 2,625; p = 0,6224. MEE: Pre: 17859; 0 min: 17821; 5 min: 18045; 15 min: 17722; 45 min: 17413). Estos resultados indican que la LTPq tiene un potente efecto sobre el número de partículas de PSD95, incrementándolas a los 15 y 45 minutos; esto podría tener implicancias importantes para la función sináptica.

4.3.3 Efectos de la LTPq sobre la señal de sinapsina

Se evaluaron los efectos de la LTPq sobre la señal de la proteína presináptica sinapsina (**Figura 21-A**).

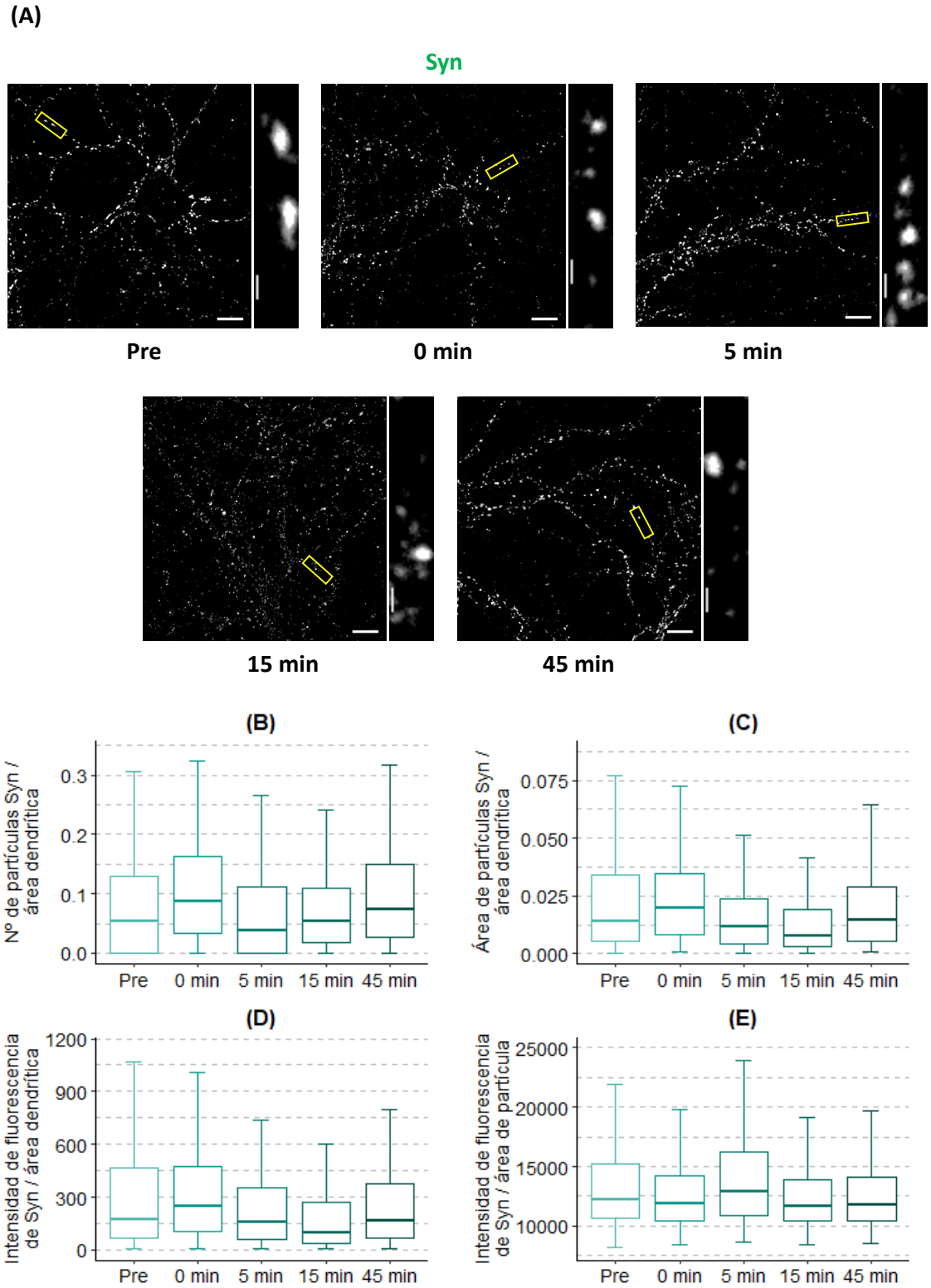


Figura 21: Las neuronas hipocampales sometidas a LTPq no muestran cambios en la señal de la proteína presináptica sinapsina en tiempos posteriores al estímulo respecto al tiempo pretratamiento

(A) Neuronas hipocampales de 18 DIV fueron sometidas a una LTPq, fijadas previamente al tratamiento (Pre) y a 0, 5, 15 y 45 minutos posteriores al mismo y finalmente inmunomarcadas contra la proteína presináptica sinapsina. El recuadro amarillo indica la ampliación que se muestra a la derecha de cada imagen. Escalas: Izq.: 10 µm, Der.: 1 µm. Se cuantificaron **(B)** la densidad, **(C)** el área y **(D)** la intensidad de fluorescencia de las partículas de sinapsina por área dendrítica. También se cuantificó **(E)** la intensidad de fluorescencia de las partículas de sinapsina por área de partícula. Los datos por grupo se muestran en gráficos de cajas (mediana y rango intercuartílico) y bigotes (valores mínimos y máximos no atípicos). Sin diferencias significativas respecto del grupo Pre mediante prueba de Tukey. Los datos corresponden a dos experimentos independientes. Número de neuronas = Pre: 21; 0 min: 19; 5 min: 11; 15 min: 19; 45 min: 16.

Las medianas (Q1; Q3) de densidad de sinapsina fueron 0,056 (0; 0,133), 0,095 (0,036; 0,18), 0,041 (0; 0,116), 0,054 (0,019; 0,112) y 0,078 (0,032; 0,164) partículas por unidad de área dendrítica para los tratamientos Pre, 0 min, 5 min, 15 min y 45 min, respectivamente. La prueba de Wald para el GLMM de los datos fue significativa (**Figura 21-B**; $\chi^2_{(4)}$ = 10,812; *p* = 0,0288) pero sin diferencias estadísticas de los tiempos pos-estímulo respecto al tiempo Pre (MME: Pre: 0,077; 0 min: 0,119; 5 min: 0,069; 15 min: 0,067; 45 min: 0,102. Prueba de Tukey: Pre vs 0 min, *p* = 0,2067; Pre vs 5 min, *p* = 0,9921; Pre vs 15 min, *p* = 0,9603; Pre vs 45 min, *p* = 0,6706). Resultados similares se observaron para el área de partículas de sinapsina respecto del área dendrítica, con medianas (Q1; Q3) de 0,014 (0,005; 0,035), 0,02 (0,009; 0,037), 0,012 (0,004; 0,025), 0,008 (0,003; 0,02) y 0,0152 (0,005; 0,031) (**Figura 21-C**; Prueba de Wald: $\chi^2_{(4)}$ = 16,997; *p* = 0,0019. MME: Pre: 0,022; 0 min: 0,028; 5 min: 0,019; 15 min: 0,017; 45 min: 0,024. Prueba de Tukey: Pre vs 0 min, *p* = 0,3136; Pre vs 5 min, *p* = 0,825; Pre vs 15 min, *p* = 0,2684; Pre vs 45 min, *p* = 0,9781) y para la intensidad de la señal de sinapsina respecto al área dendrítica, con medianas (Q1;Q3) de 196 (68,6; 556,3), 276,9 (117; 546,2), 171 (58,1; 381,5), 98,4 (39,8; 274,4) y 186,1 (72,2; 438,2), para los grupos Pre, 0 min, 5 min, 15 min y 45 min respectivamente (**Figura 21-D**; Prueba de Wald: $\chi^2_{(4)}$ = 15,687; *p* = 0,0035. MME: Pre: 333; 0 min: 421; 5 min: 291; 15 min: 255; 45 min: 352. Prueba de Tukey: Pre vs 0 min, *p* = 0,3558; Pre vs 5 min, *p* = 0,9087; Pre vs 15 min, *p* = 0,2602; Pre vs 45 min, *p* = 0,9936). Las medianas (Q1; Q3) para la intensidad de la señal de sinapsina respecto área de cada partícula fueron 12225 (10687; 15213), 11860 (10400; 14193), 12846 (10933; 16180), 11633 (10383; 13900) y 11783 (10458; 14151) para los grupos Pre, 0 min, 5 min, 15 min y 45 min, respectivamente. La prueba de Wald para el GLMM de los datos fue significativa (**Figura 21-E**; $\chi^2_{(4)}$ = 22,729; *p* = 0,0001), mostrando el grupo a 15 minutos una media marginal estimada menor que el tiempo Pre con una diferencia estadística cercana al valor de significancia (MME: Pre: 13066; 0 min: 12664; 5 min: 13504; 15 min: 12565; 45 min: 12652. Prueba de Tukey: Pre vs 0 min, *p* = 0,1899; Pre vs 5 min, *p* = 0,3266; Pre vs 15 min, *p* = 0,0751; Pre vs 45 min, *p* = 0,2119). Estos

resultados indican que la LTPq no induce cambios en sinapsina que se alejen significativamente de los valores basales para los tiempos evaluados.

Los resultados de este capítulo hasta acá expuestos muestran que la LTPq indujo cambios estadísticamente significativos respecto a la condición basal (Pre) tanto en la señal de acetilación dendrítica (densidad, área, intensidad de fluorescencia) como en la proteína posináptica PSD95 (densidad), indicando que son regulados durante este evento de plasticidad, mientras que en la proteína presináptica sinapsina no indujo variaciones significativas. En la **Figura 22** se resumen los resultados ya presentados de densidad de partículas para AcLys, PSD95 y Syn; se muestran las medias marginales estimadas de los modelos (MME) relativizados al tiempo Pre y se denotan las diferencias estadísticas significativas con el tiempo Pre con asteriscos para cada señal. De esta forma, queda claro que, luego del LTPq, hay un primer aumento en la densidad de AcLys que es seguido del aumento en PSD95.

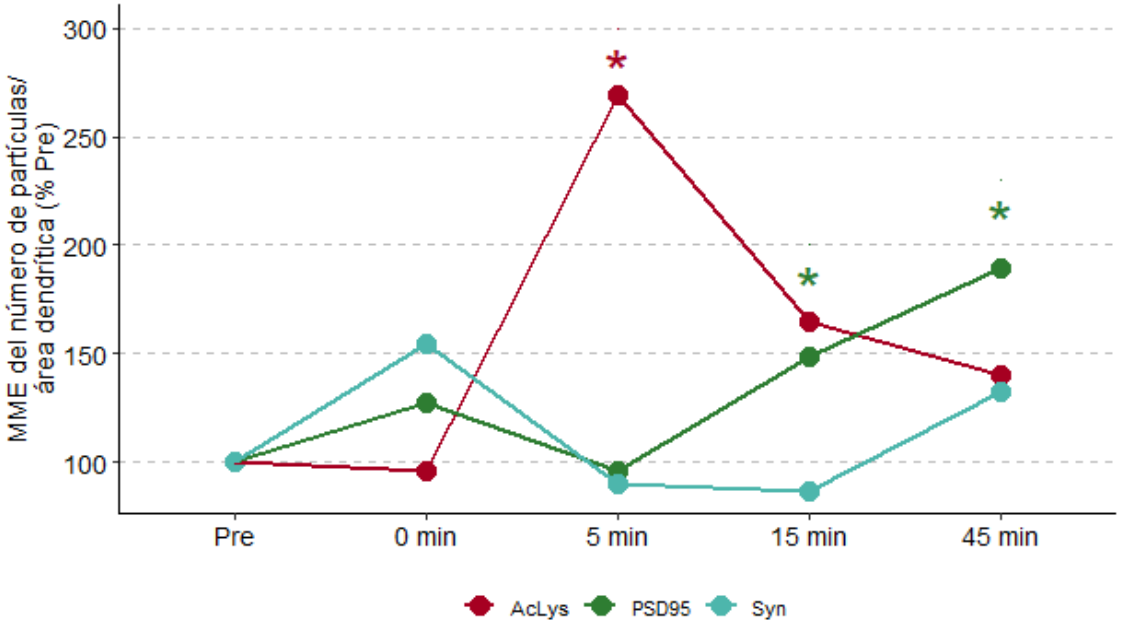
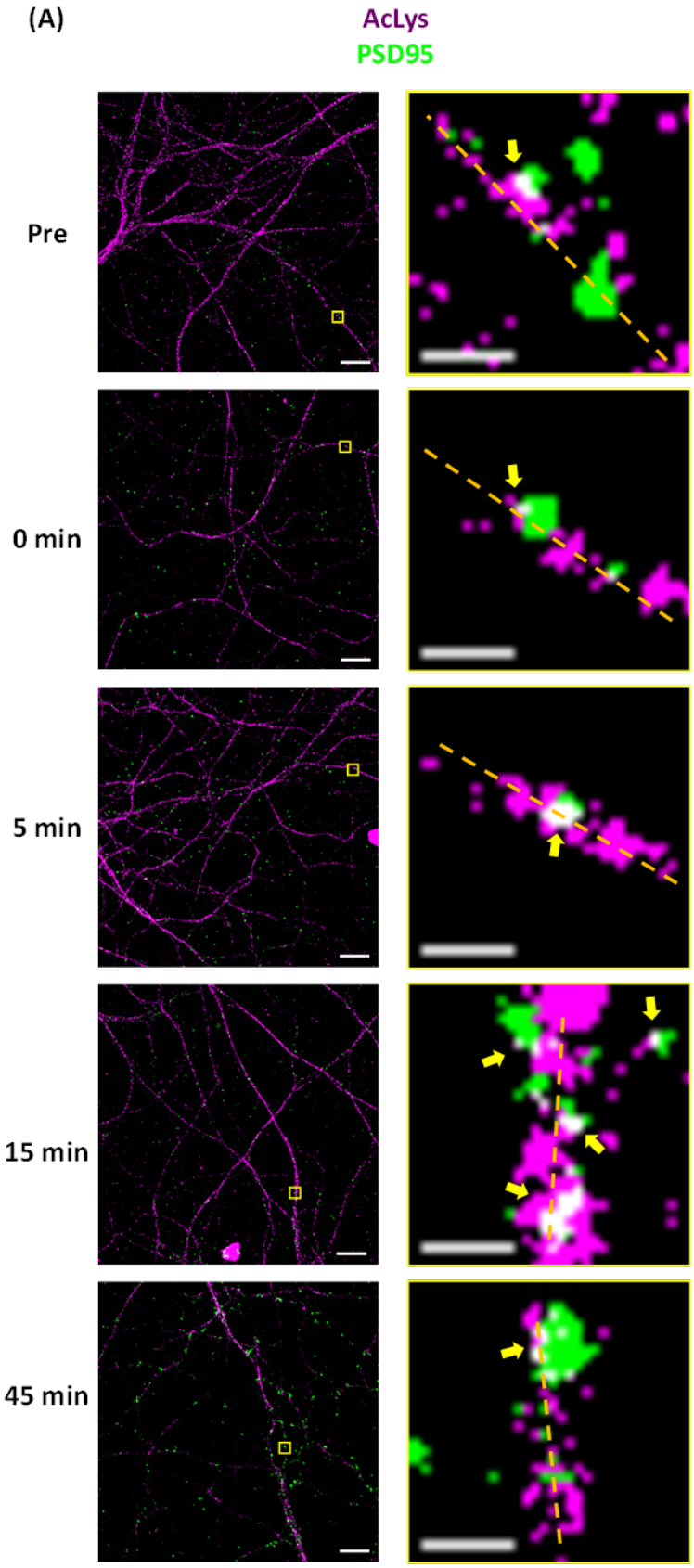


Figura 22: MME de las densidades de partículas para AcLys, PSD95 y Syn, relativizadas a cada tiempo Pre
Los puntos de colores muestran las medias marginales estimadas de los modelos para el número de partículas de AcLys (rojo), PSD95 (verde) y sinapsina (celeste) por área dendrítica, relativizados a la MME del tiempo Pre. Los asteriscos muestran diferencias estadísticas significativas con el tiempo Pre, para cada señal.

Nos interesó, seguidamente, evaluar la dinámica de la acetilación sináptica. Con ese propósito, analizamos, por un lado, la colocalización de AcLys con PSD95 (acetilación posináptica; AcLys+PSD95+) y, por otro lado, con Syn (acetilación presináptica; AcLys+Syn+). En ambos casos, se evaluaron los mismos cuatro parámetros antes estudiados.

4.3.4 Colocalización de AcLys con PSD95

A partir de los mismos cultivos co-marcados para AcLys y PSD95 evaluados en las secciones anteriores de este capítulo estudiamos la colocalización de ambas señales. En la **Figura 23-A** se muestran imágenes de neuronas representativas de cada tiempo filtradas para un umbral mínimo de cada señal y binarizadas. En magenta se muestra la señal de AcLys y en verde la de PSD95. En la columna de la izquierda se muestran las neuronas con bajo aumento y en la columna de la derecha se muestran fragmentos ampliados de las neuronas, con líneas punteadas que marcan el sentido de las dendritas y flechas amarillas que indican las zonas de colocalización, que se ven en color blanco.


(A)
AcLys
PSD95
Pre
0 min
5 min
15 min
45 min

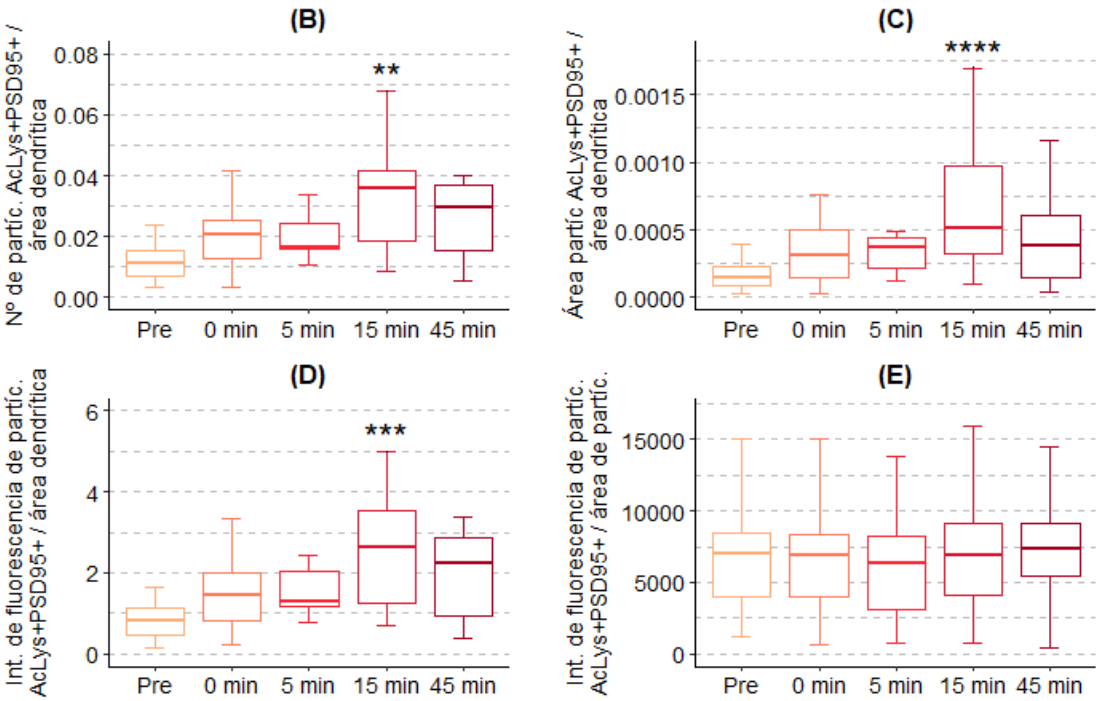


Figura 23: La señal de AcLys que colocaliza con PSD95 aumenta 15 minutos después de la LTPq
(A) Neuronas hipocampales de 18 DIV fueron sometidas a una LTPq, fijadas previamente al tratamiento (Pre) y a 0, 5, 15 y 45 minutos posteriores al mismo y finalmente inmunomarcadas contra AcLys (magenta) y contra la proteína de la densidad posináptica PSD95 (verde). Las imágenes se muestran filtradas para un umbral mínimo de cada señal y binarizadas. En la fila de la izquierda se muestra una neurona por cada tiempo evaluado; el recuadro amarillo indica la ampliación que se muestra en la columna de la derecha. Las líneas punteadas marcan el sentido de las dendritas y las flechas amarillas indican las zonas de colocalización que se ven en color blanco. Escalas: Izq.: 10 µm, Der.: 1 µm. Se cuantificaron **(B)** la densidad, **(C)** el área y **(D)** la intensidad de fluorescencia de las partículas de AcLys que colocalizan con las partículas de PSD95. También se cuantificó **(E)** la intensidad de fluorescencia de las partículas AcLys+PSD95+ por área de la misma. Los datos por grupo se muestran en gráficos de cajas (mediana y rango intercuartílico) y bigotes (valores mínimos y máximos no atípicos). (*) $p < 0,05$; (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$; prueba de Tukey. Los datos corresponden a dos experimentos independientes. Número de neuronas = Pre: 20; 0 min: 20; 5 min: 10; 15 min: 20; 45 min: 20.

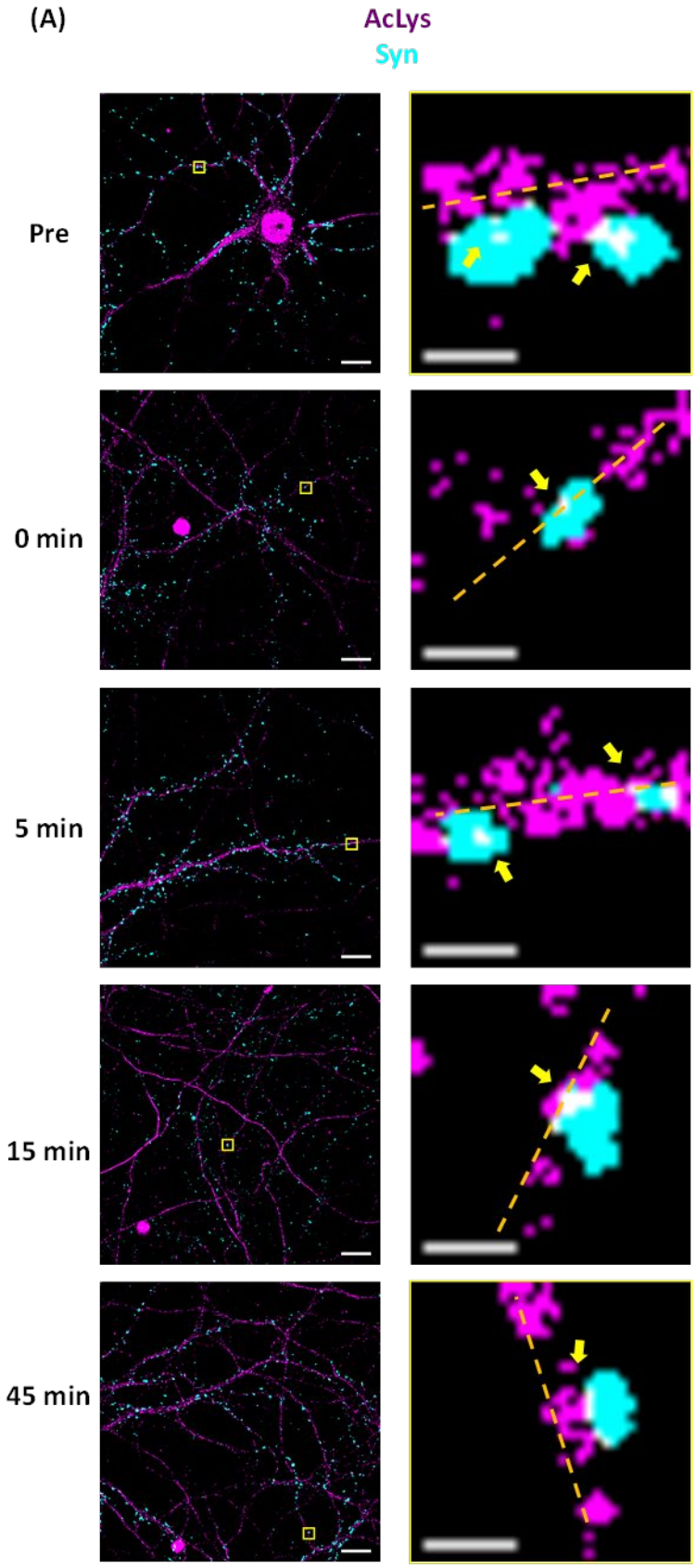
Las medianas (Q1; Q3) de densidad de partículas AcLys que colocalizaron con PSD95 fueron 0,011 (0,007; 0,015), 0,02 (0,013; 0,025), 0,017 (0,016; 0,024), 0,038 (0,019; 0,052) y 0,03 (0,017; 0,038) para los grupos Pre, 0 min, 5 min, 15 min y 45 min, respectivamente. La prueba de Wald para el GLMM fue significativa (**Figura 23-B**; $\chi^2_{(4)} = 22,729$; $p = 0,0001$) y la prueba *post hoc* de Tukey sobre las medias marginales estimadas (MME) del modelo mostraron un aumento estadísticamente significativo de la densidad a los 15 minutos en un 73% respecto del tiempo Pre (MME: Pre: 0,022; 0 min: 0,026; 5 min: 0,031; 15 min: 0,038; 45 min: 0,031. 15 min / Pre = 1,73. Prueba de Tukey: Pre vs 0 min, $p = 0,7896$; Pre vs 5 min, $p = 0,2804$; Pre vs 15 min, $p = 0,0019$; Pre vs 45 min, $p = 0,1575$). Las medianas (Q1; Q3) de área de partículas AcLys+PSD+ por unidad de área dendrítica fueron $15x10^{-5}$ ($8x10^{-5}$; $23x10^{-5}$), $31x10^{-5}$ ($14x10^{-5}$; $50x10^{-5}$), $38x10^{-5}$

($21x10^{-5}$; $45x10^{-5}$), $51x10^{-5}$ ($32x10^{-5}$; $97x10^{-5}$) y $40x10^{-5}$ ($15x10^{-5}$; $62x10^{-5}$) para los grupos Pre, 0 min, 5 min, 15 min y 45 min, respectivamente. La prueba de Wald para el GLMM fue significativa (**Figura 23-C**; $\chi^2_{(4)}$ = 23,032; p = 0,0001). El área de las partículas AcLys+PSD+ respecto del área dendrítica tendió a aumentar a los 5 minutos y se diferenció significativamente a los 15 minutos respecto al tiempo Pre (MME: Pre: $31x10^{-5}$; 0 min: $42x10^{-5}$; 5 min: $52x10^{-5}$; 15 min: $65x10^{-5}$; 45 min: $45x10^{-5}$. Prueba de Tukey: Pre vs 0 min, p = 0,4049; Pre vs 5 min, p = 0,064; Pre vs 15 min, p < 0,0001; Pre vs 45 min, p = 0,2143). La MME de 15 minutos fue un 111% mayor que la del tiempo Pre (15 min / Pre = 2,106). Las medianas (Q1; Q3) de intensidad de fluorescencia de partículas AcLys+PSD+ por área dendrítica fueron 0,83 (0,45; 1,14), 1,44 (0,84; 1,98), 1,3 (1,18; 2,05), 2,85 (1,32; 4) y 2,34 (1,08; 2,96) para los grupos Pre, 0 min, 5 min, 15 min y 45 min, respectivamente. La prueba de Wald para el GLMM fue significativa (**Figura 23-D**; $\chi^2_{(4)}$ = 18,281; p = 0,0011). La intensidad de fluorescencia mostró un aumento significativo a 15 min respecto del tiempo Pre (MME: Pre: 1,58; 0 min: 1,96; 5 min: 2,44; 15 min: 2,96: 45 min: 2,32. Prueba de Tukey: Pre vs 0 min, p = 0,6924; Pre vs 5 min, p = 0,1401; Pre vs 15 min, p = 0,0005; Pre vs 45 min, p = 0,1365) con una MME un 87% mayor (15 min / Pre = 1,87). Las medianas (Q1; Q3) de intensidad de fluorescencia de partículas AcLys+PSD+ por unidad de área de partícula fueron 7000 (4000; 8500), 7000 (3971; 8625), 6563 (3172; 8531), 7000 (4139; 9250) y 7625 (6250; 9875) para los grupos Pre, 0 min, 5 min, 15 min y 45 min, respectivamente. La prueba de Wald para el GLMM fue significativa (**Figura 23-E**; $\chi^2_{(4)}$ = 11,199; p = 0,0244). Las intensidades de fluorescencia por área de partícula en los tiempos pos-estímulo no mostraron diferencias con el tiempo Pre (MME: Pre: 8166; 0 min: 7361; 5 min: 6929; 15 min: 7536; 45 min: 8247. Prueba de Tukey: Pre vs 0 min, p = 0,3699; Pre vs 5 min, p = 0,163; Pre vs 15 min, p = 0,5779; Pre vs 45 min, p = 0,9997). Solamente se observa una tendencia entre los tiempos 5 y 45 min (Prueba de Tukey: p = 0,075). Estos resultados indican que la LTPq inducida por un shock de glicina a alta concentración genera cambios en los niveles de acetilación en la posinapsis, señalando que la acetilación de proteínas de dicho compartimento neuronal está regulada durante este proceso de plasticidad *in vitro*.

4.3.5 Colocalización de AcLys con sinapsina

En la **Figura 24-A** se muestran imágenes de neuronas representativas de cada tiempo filtradas para un umbral mínimo de cada señal y binarizadas. En magenta se

muestra la señal de AcLys y en cian la de PSD95. Las señales que colocalizan se ven en blanco.



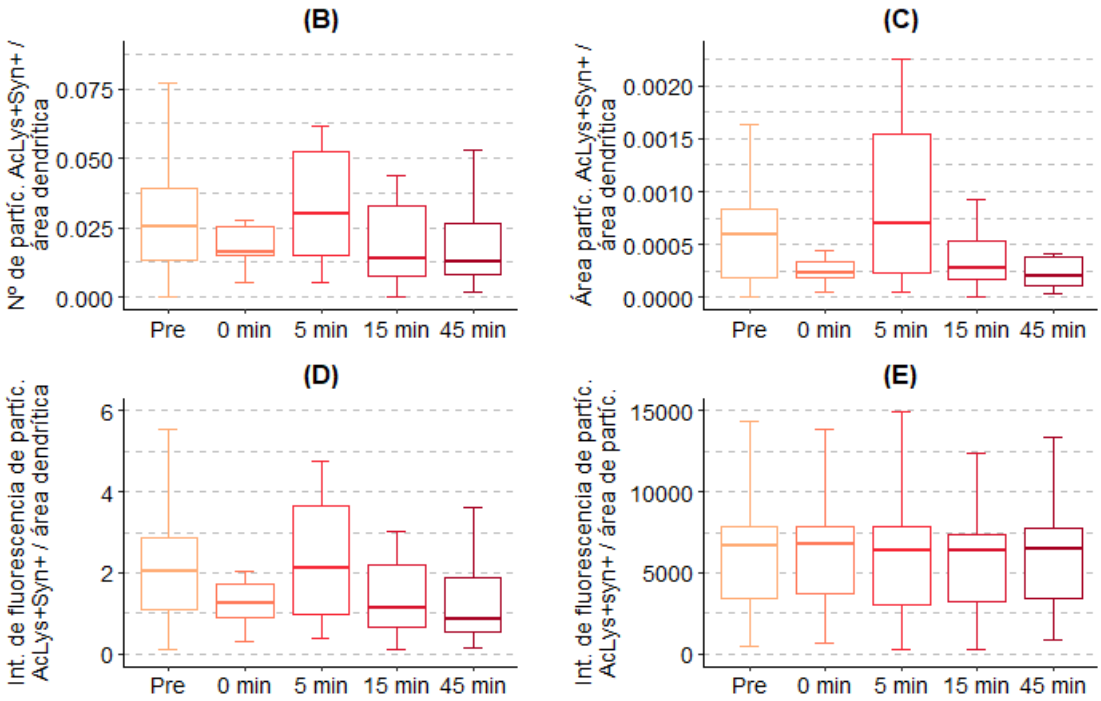


Figura 24: La señal de AcLys que colocaliza con Syn no cambia tras la LTP
(A) Neuronas hipocampales de 18 DIV fueron sometidas a una LTPq, fijadas previamente al tratamiento (Pre) y a 0, 5, 15 y 45 minutos posteriores al mismo y finalmente inmunomarcadas contra AcLys (magenta) y contra la proteína presináptica sinapsina (cian). Las imágenes se muestran filtradas para un umbral mínimo de cada señal y binarizadas. En la fila de la izquierda se muestra una neurona por cada tiempo evaluado; el recuadro amarillo indica la ampliación que se muestra en la columna de la derecha. Las líneas punteadas marcan el sentido de las dendritas y las flechas amarillas indican las zonas de colocalización que se ven en color blanco. Escalas: Izq.: 10 µm, Der.: 1 µm. Se cuantificaron **(B)** la densidad, **(C)** el área y **(D)** la intensidad de fluorescencia de las partículas de AcLys que colocalizan con las partículas de Syn. También se cuantificó **(E)** la intensidad de fluorescencia de las partículas AcLys+Syn+ por área de la misma. Los datos por grupo se muestran en gráficos de cajas (mediana y rango intercuartílico) y bigotes (valores mínimos y máximos no atípicos). Sin diferencias significativas respecto del grupo Pre mediante prueba de Tukey. Los datos corresponden a dos experimentos independientes. Número de neuronas = Pre: 20; 0 min: 19; 5 min: 10; 15 min: 17; 45 min: 17.

Las medianas (Q1; Q3) de densidad de partículas AcLys que colocalizaron con sinapsina fueron 0,025 (0,013; 0,039), 0,017 (0,015; 0,025), 0,03 (0,015; 0,052), 0,014 (0,008; 0,033) y 0,017 (0,008; 0,034) para los grupos Pre, 0 min, 5 min, 15 min y 45 min, respectivamente. No se observaron diferencias estadísticas significativas entre los grupos (**Figura 24-B**; Prueba de Wald: $\chi^2_{(4)} = 4{,}103$; $p = 0{,}3923$. MME: Pre: 0,029; 0 min: 0,026; 5 min: 0,038; 15 min: 0,02; 45 min: 0,027). Las medianas (Q1; Q3) de área de partículas AcLys+Syn+ por unidad de área dendrítica fueron $59\text{x}10^{-5}$ ($19\text{x}10^{-5}$; $84\text{x}10^{-5}$), $24\text{x}10^{-5}$ ($19\text{x}10^{-5}$; $39\text{x}10^{-5}$), $71\text{x}10^{-5}$ ($23\text{x}10^{-5}$; $154\text{x}10^{-5}$), $28\text{x}10^{-5}$ ($18\text{x}10^{-5}$; $53\text{x}10^{-5}$) y $27\text{x}10^{-5}$ ($12\text{x}10^{-5}$; $52\text{x}10^{-5}$) para los grupos Pre, 0 min, 5 min, 15 min y 45 min, respectivamente. La prueba de Wald para el GLMM fue no significativa (**Figura 24-C**; $\chi^2_{(4)} = 1{,}943$; $p = 0{,}7462$. MME: Pre: $62\text{x}10^{-5}$; 0 min: $59\text{x}10^{-5}$; 5 min: $76\text{x}10^{-5}$; 15 min: $58\text{x}10^{-5}$; 45 min: $54\text{x}10^{-5}$). Las medianas (Q1; Q3) de intensidad de fluorescencia de

partículas AcLys+Syn+ por área dendrítica fueron 2,05 (1,08; 2,87), 1,31 (0,93; 1,8), 2,11 (0,97; 3,66), 1,13 (0,66; 2,2) y 1,21 (0,56; 2,34) para los grupos Pre, 0 min, 5 min, 15 min y 45 min, respectivamente. No se observaron diferencias estadísticas significativas entre los grupos (**Figura 24-D**; Prueba de Wald: $\chi^2_{(4)} = 2{,}244$; $p = 0{,}6909$. MEE: Pre: 2,07; 0 min: 2,1; 5 min: 2,5; 15 min: 1,9; 45 min: 1,88). Las medianas (Q1; Q3) de intensidad de fluorescencia de partículas AcLys+Syn+ por unidad de área de partícula fueron 6625 (3441; 8000), 6875 (3706; 8000), 6455 (3037; 7875), 6375 (3211; 7469) y 6500 (3420; 7875) para los grupos Pre, 0 min, 5 min, 15 min y 45 min, respectivamente. La prueba de Wald para el GLMM fue significativa (**Figura 24-E**; $\chi^2_{(4)} = 12{,}68$; $p = 0{,}013$). Las intensidades de fluorescencia por área de partícula en los tiempos pos-estímulo no mostraron diferencias con el tiempo Pre (MME: Pre: 6329; 0 min: 6952; 5 min: 5660; 15 min: 6148; 45 min: 6828. Prueba de Tukey: Pre vs 0 min, $p = 0{,}4246$; Pre vs 5 min, $p = 0{,}4238$; Pre vs 15 min, $p = 0{,}9869$; Pre vs 45 min, $p = 0{,}6859$). Se observan diferencias estadísticas significativas entre los tiempos 5 vs 0 min y una tendencia en 5 vs 45 min (Prueba de Tukey: 5 vs 0 min: $p = 0{,}017$; 5 vs 45 min: $p = 0{,}0515$). Estos resultados evidencian que la PLTq no genera cambios en los niveles de acetilación asociados a la presinapsis en los tiempos observados.

En resumen de esta sección, observamos que la LTPq induce un aumento de la AcLys asociada a la proteína posináptica PSD95 15 minutos luego de la estimulación, sin embargo no se observan cambios de AcLys asociados a la proteína presináptica sinapsina. En la **Figura 25** se grafican los resultados ya presentados de densidad de partículas para AcLys sináptica (AcLys+PSD95+ y AcLys+Syn+); se muestran las medias marginales estimadas de los modelos (MME) relativizados al tiempo Pre y se denotan las diferencias estadísticas significativas con el tiempo Pre con asteriscos para cada señal. Se remarca cómo la señal de AcLys+PSD95+ muestra un aumento sostenido hasta los 15 y luego comienza a decaer, mientras que la señal de AcLys+Syn+ fluctúa alrededor del valor base. Patrones similares presentan los otros tres parámetros de colocalización.

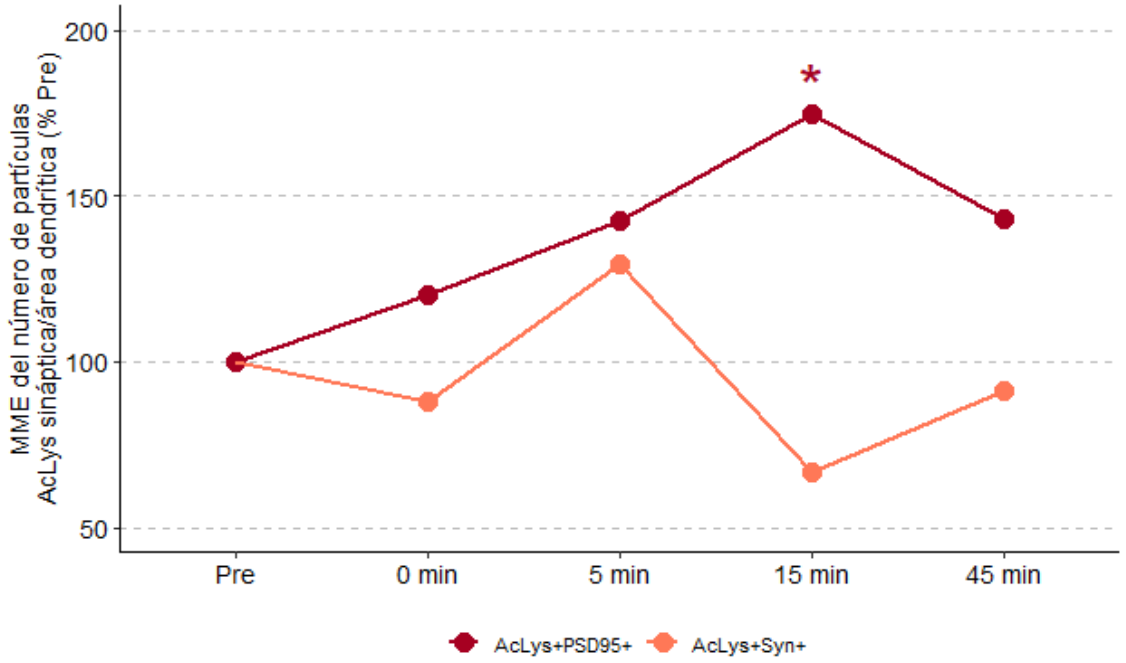


Figura 25: MME de las densidades de partículas de AcLys sináptica, relativizadas a cada tiempo Pre
Los puntos de colores muestran las medias marginales estimadas de los modelos para el número de partículas de AcLys+PSD95+ (rojo) y AcLys+Syn+ (naranja) por área dendrítica, relativizados a la MME del tiempo Pre. Las diferencias estadísticas significativas con el tiempo Pre se muestran con asteriscos.

4.4 Discusión

La LTP inducida químicamente con altas concentraciones de glicina causa cambios en los niveles de acetilación dendrítica y en la composición de las proteínas sinápticas sobre las dendritas secundarias de neuronas de hipocampo en cultivo primario (**Figura 19**, **Figura 20** y **Figura 21**). La ausencia de cambios en los parámetros de sinapsina es destacable en vista de que la Sinapsina 1 interactúa directamente con tubulina (Bennett et al., 1991). Es interesante observar la secuencia de los cambios observados, siendo el primero el aumento en la densidad, el área y la intensidad de partículas AcLys (iniciando a 5 minutos desde la estimulación) y, seguidamente, el aumento en la densidad de partículas de la proteína de la densidad posináptica PSD95 (iniciando a 15 minutos desde la estimulación) (**Figura 22**). Esto podría sugerir una relación funcional entre estas dos olas de cambio. Las variaciones observadas en AcLys posiblemente correspondan a cambios en la acetilación de tubulina, ya que la misma precipita con el anticuerpo anti-AcLys en ensayos de inmunoprecipitación (resultados no publicados del laboratorio) y además es la principal proteína reconocida por anti-AcLys (**Figura 11**). Estos resultados están en consonancia con reportes que indican que luego de un protocolo de inducción de LTP los microtúbulos invaden las espinas dendríticas activas por un mecanismo dependiente de actina (Merriam et al., 2013;

Mitsuyama et al., 2008; Schätzle et al., 2018) y con un reporte de que hay un pool de microtúbulos presinápticos que es regulado por actividad (Parato & Bartolini, 2021).

La LTPq indujo cambios en la colocalización de entre AcLys y PSD95, pero no entre AcLys y Syn (**Figura 23**, **Figura 24** y **Figura 25**); esto sugiere que hay un arreglo estructural en la posinapsis luego de la LTP que involucra la señalización mediada por microtúbulos asociada a PSD95. En cultivos primarios de neuronas de hipocampo de rata tratadas por 12 horas con el inhibidor de KDACs de clase I y II, TSA, se observó un aumento en la densidad de partículas de PSD95 pero no así de marcadores presinápticos. También se encontró un aumento en la acetilación de la proteína cortactina, la cual se encuentra tanto en la densidad posináptica como en el cuerpo de la dendrita; la cortactina acetilada era encontrada mayormente en el cuerpo de la dendrita. Los autores propusieron que la acetilación de cortactina sináptica afecta su unión a proteínas de la densidad posináptica induciéndola a migrar al cuerpo de la dendrita, lo que traería como consecuencia la liberación de la inhibición al *clustering* de PSD95 (Catarino et al., 2013). Esto revela la estrecha relación entre PSD95 y la modulación por acetilación de las proteínas con las que interactúa.

El aumento en el número de partículas de PSD95 tras la inducción de la LTP (**Figura 20-B**) apoya los resultados de Clavet-Fournier y colaboradores, que encontraron que la LTPq induce un aumento en el número de partículas de PSD95 en tiempos similares a los evaluados en este trabajo (Clavet-Fournier et al., 2023). Ellos encuentran que, tras la LTP, las estructuras que forma PSD95 en la sinapsis cambian de proporción, pasando de una alta frecuencia relativa de estructuras tipo mácula (que se reconoce como una sola partícula) a una mayor frecuencia de estructuras fragmentadas (que se reconocen como varias partículas en una misma espina). Si esto mismo estuviera pasando en los cultivos que evaluamos, eso explicaría por qué sólo vemos un aumento en el número de partículas de PSD95 y ningún cambio en los demás parámetros. Cabe aclarar que en el trabajo de Clavet-Fournier logran identificar cada espina y evaluarla en el tiempo, lo cual no fue posible con nuestra metodología.

Concluimos que la plasticidad sináptica inducida por la LTPq aquí estudiada afecta la organización de las espinas dendríticas a través de un proceso que involucra la acetilación de proteínas (posiblemente tubulina) y el *clustering* de PSD95. Nuestros datos sugieren que esto ocurre principalmente en las posinapsis y apoya a los resultados reportados por nuestro laboratorio en los que cambios similares en acetilación y *clustering* de PSD95 se observan en el hipocampo de ratones durante la consolidación de la memoria de largo término (Esquivel, 2017).

Capítulo 5: Discusión general y conclusiones

En esta tesis estudiamos el papel de la acetilación de proteínas sinápticas durante la consolidación de la memoria de evitación inhibitoria en ratón. Con este fin evaluamos, en primer lugar, el efecto de la inhibición de deacetilasas sobre la retención memoria de largo término. En el **capítulo 2** de este trabajo hallamos que la inhibición específica de la deacetilasa KDAC6, mediante Tubastatina A durante la ventana de consolidación de la memoria de largo término de EI, facilita la misma. La facilitación ocurre tanto cuando se administra el inhibidor de forma intraperitoneal como cuando se administra directamente en el hipocampo. Esto último indica que la actividad de KDAC6 en el hipocampo es parte del sistema que modula el almacenamiento de memorias. En trabajos previos de nuestro laboratorio vimos que, durante la consolidación de la memoria de EI, los niveles de AcLys aumentaban en extractos eDPS de hipocampo. Como mostramos en este trabajo, la banda de AcLys se superpone con la banda de tubulina. En segundo lugar, evaluamos la inhibición de deacetilasas sobre la retención memoria de largo término y observamos que la inhibición de la acetiltransferasa NAT10 en el hipocampo con Remodelina conlleva a la facilitación de la memoria de largo. El mecanismo por el cual logra el mencionado efecto es aún desconocido, aunque hipotetizamos que podría ser mediante modificaciones del ARN.

Teniendo en mente el posible papel de la tubulina sináptica durante la consolidación de la memoria, en el **capítulo 3** exploramos la acción de distintos inhibidores de KDACs sobre la acetilación de tubulina, confirmando que KDAC6 deacetila dicha proteína *in vitro* e *in vivo*, aunque no es la única. Además, encontramos evidencia de que la acetilación de tubulina en la sinapsis hipocampal es regulada durante la consolidación de la memoria de largo término en sitios distintos a K40 de α-tubulina. Este resultado va en consonancia con reportes en los que otras acetilaciones de α-tubulina, como K394, son abundantes en el sistema nervioso (F. Liu et al., 2024; Saunders et al., 2022) y además son deacetiladas por KDAC6 (N. Liu et al., 2015). Por ejemplo la acetilación K394 de α-ubulina está involucrada en la morfogénesis sináptica en Drosophila (Saunders et al., 2022).

Con la idea de establecer de forma más directa el papel de la acetilación de proteínas durante la plasticidad sináptica y definir subcelularmente dónde ocurren los cambios que involucran la acetilación de proteínas, usamos el modelo de LTP. Los estudios realizados en cultivos neuronales primarios de baja densidad son una herramienta que ha permitido históricamente la disección de los cambios moleculares y celulares durante la plasticidad sináptica.

En el **capítulo 4** reportamos los efectos de la LTP inducida químicamente sobre la acetilación dendrítica y sináptica y sobre la composición de la sinapsis. Hallamos que la estimulación induce, en primer lugar, un aumento de la acetilación dendrítica a los 5 minutos y, luego, un aumento en la densidad de partículas de PSD95 a 15 y 45 minutos. En las sinapsis, PSD95 se encuentra en un complejo proteico que organiza receptores y moléculas involucradas en la transducción de señales en la zona de contacto. En este complejo son abundantes α y β tubulina (Dosemeci et al., 2007). En las dendritas, la interacción entre PSD95 y los microtúbulos (mediada por EB3) es parte del mecanismo que define la morfología dendrítica (Sweet et al., 2011). Por otro lado, la inhibición de la polimerización de microtúbulos mediante la administración de nocodazol impide la retención de la memoria de miedo contextual, mientras que la inclusión de paclitaxel (para estabilizar las MT) o el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) rescató la retención. Además, el nocodazol también inhibió el aumento en la densidad de espinas en el hipocampo y la corteza después del condicionamiento contextual del miedo (Fanara et al., 2010). Dado que en nuestros experimentos las principales acetilaciones de lisina detectadas son en tubulina, pensamos que puede haber una relación causal en la secuencia de aumento en las partículas de AcLys (5 min) seguida del aumento de partículas de PSD95 (15 y 45 min). Esta idea está también apoyada en que en el tiempo intermedio, 15 min, se ve un aumento de la señal de acetilación asociada a PSD95. Mientras que la inducción de la LTP no indujo cambios en la señal de AcLys asociada a la proteína presináptica sinapsina1. Estos resultados sugieren que hay una señalización mediada por acetilación en la posinapsis asociada a una reorganización de PSD95.

Estos resultados refuerzan lo visto *in vivo* durante la consolidación de la memoria de EI en los que un aumento en la acetilación en extractos eDPS coincide con un aumento en el *clustering* de PSD95 45 min luego de terminado el entrenamiento (Esquivel, 2017). También apuntan a que la facilitación de la memoria de EI por la inhibición de KDAC6 podría estar sustentada en cambios en la acetilación de proteínas sinápticas, en particular tubulina.

La correlación entre aumentos en acetilación sináptica y *clustering* de PSD95 son para nosotros un posible sustrato a los efectos vistos tanto en la facilitación mediada por la inhibición de KDAC6 como en los cambios vistos después de la inducción de plasticidad sináptica en cultivos neuronales.

Los resultados presentados en esta tesis son relevantes para profundizar en el entendimiento del proceso fisiológico de la consolidación de memorias, como también pueden ser útiles para comprender las patologías asociadas a la formación de

memorias. La inhibición de KDAC6 se ha asociado a mejoras cognitivas en modelos animales de Enfermedad de Alzheimer (Govindarajan et al., 2013), y en personas con dicha patología se ha observado 31% más cantidad de la proteína KDAC6 en muestras de corteza frontal respecto de personas sanas (Anderson et al., 2015). Por otro lado, se ha propuesto un mecanismo de vigilancia dependiente de KDAC6 que suprime la acumulación tóxica de la proteína tau, en un modelo de la Enfermedad de Alzheimer (Trzeciakiewicz et al., 2020). Esto evidencia que la actividad de KDAC6 y la acetilación de tubulina están ligadas al proceso de formación de memorias, tanto en modelos fisiológicos como patológicos.

Las conclusiones generales de este trabajo son:

- La acetilación de proteínas sinápticas participa de la consolidación de la memoria de largo término de evitación inhibitoria en ratones.
- La acetilación de las lisinas no-K40 de α-tubulina y las de b-tubulina en sinapsis del hipocampo son importantes para la consolidación de la memoria de largo término de evitación inhibitoria en ratones.
- La acetilación dendrítica y sináptica, como también la composición sináptica, son alteradas luego de una estimulación que induce LTP.

Referencias

Acetylated alpha Tubulin Anticuerpo (6-11B-1) | SCBT - Santa Cruz Biotechnology. (s. f.). Recuperado 28 de marzo de 2024, de https://www.scbt.com/p/acetylated-alpha-tubulin-antibody-6-11b-1

Ahlmann-Eltze, C., & Patil, I. (2021). *ggsignif: R Package for Displaying Significance Brackets for «ggplot2»*. PsyArxiv. https://psyarxiv.com/7awm6

Ahmad Ganai, S., Ramadoss, M., & Mahadevan, V. (2016). Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors—Emerging roles in neuronal memory, learning, synaptic plasticity and neural regeneration. *Current Neuropharmacology*, *14*(1), 55-71. https://doi.org/10.2174/1570159X13666151021111609

Alkadhi, K. A. (2021). NMDA receptor-independent LTP in mammalian nervous system. *Progress in Neurobiology*, *200*, 101986. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2020.101986

Alkon, D. L., Epstein, H., Kuzirian, A., Bennett, M. C., & Nelson, T. J. (2005). Protein synthesis required for long-term memory is induced by PKC activation on days before associative learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(45), 16432-16437. https://doi.org/10.1073/pnas.0508001102

Anderson, K. W., Chen, J., Wang, M., Mast, N., Pikuleva, I. A., & Turko, I. V. (2015). Quantification of Histone Deacetylase Isoforms in Human Frontal Cortex, Human Retina, and Mouse Brain. *PLOS ONE*, *10*(5), e0126592. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126592

Asthana, J., Kapoor, S., Mohan, R., & Panda, D. (2013). Inhibition of HDAC6 Deacetylase Activity Increases Its Binding with Microtubules and Suppresses Microtubule Dynamic Instability in MCF-7 Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *288*(31), 22516-22526. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.489328

Bates, D., Maechler, M., Bolker, B. M., & Walker, S. (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, *67*(1), 1-48. https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01

Bennett, A. F., Hayes, N. V., & Baines, A. J. (1991). Site specificity in the interactions of synapsin 1 with tubulin. *The Biochemical Journal*, *276 (Pt 3)*(Pt 3), 793-799. https://doi.org/10.1042/bj2760793

Blake, M. G., Boccia, M. M., Acosta, G. B., & Baratti, C. M. (2004). Posttraining administration of pentylenetetrazol dissociates gabapentin effects on memory consolidation from that on memory retrieval process in mice. *Neuroscience Letters*, *368*(2), 211-215. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.07.019

Blank, M., Dornelles, A. S., Werenicz, A., Velho, L. A., Pinto, D. F., Fedi, A. C., Schröder, N., & Roesler, R. (2014). Basolateral amygdala activity is required for enhancement of memory consolidation produced by histone deacetylase inhibition in the hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory*, *111*, 1-8. https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.02.009

Boccia, M., Freudenthal, R., Blake, M., De La Fuente, V., Acosta, G., Baratti, C., & Romano, A. (2007). Activation of Hippocampal Nuclear Factor-κB by Retrieval Is

Required for Memory Reconsolidation. *The Journal of Neuroscience*, *27*(49), 13436-13445. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4430-07.2007

Boccia, M. M., Acosta, G. B., Blake, M. G., & Baratti, C. M. (2004). Memory consolidation and reconsolidation of an inhibitory avoidance response in mice: Effects of i.c.v. injections of hemicholinium-3. *Neuroscience*, *124*(4), 735-741. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.01.001

Boccia, M. M., & Baratti, C. M. (2000). Involvement of Central Cholinergic Mechanisms in the Effects of Oxytocin and an Oxytocin Receptor Antagonist on Retention Performance in Mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, *74*(3), 217-228. https://doi.org/10.1006/nlme.1999.3954

Boyault, C., Sadoul, K., Pabion, M., & Khochbin, S. (2007). HDAC6, at the crossroads between cytoskeleton and cell signaling by acetylation and ubiquitination. *Oncogene*, *26*(37), 5468-5476. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210614

Brooks, M., Kristensen, K., Benthem, K. J. van, Magnusson, A., Berg, C. W., Nielsen, A., Skaug, H. J., Maechler, M., & Bolker, B. M. (2017). glmmTMB Balances Speed and Flexibility Among Packages for Zero-inflated Generalized Linear Mixed Modeling. *The R Journal*, *9*(2), 378-400.

Butler, K. V., Kalin, J., Brochier, C., Vistoli, G., Langley, B., & Kozikowski, A. P. (2010). Rational Design and Simple Chemistry Yield a Superior, Neuroprotective HDAC6 Inhibitor, Tubastatin A. *Journal of the American Chemical Society*, *132*(31), 10842-10846. https://doi.org/10.1021/ja102758v

Cammarota, M., Bevilaqua, L. R. M., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2004). Retrieval Does Not Induce Reconsolidation of Inhibitory Avoidance Memory. *Learning & Memory*, *11*(5), 572-578. https://doi.org/10.1101/lm.76804

Cane, M., Maco, B., Knott, G., & Holtmaat, A. (2014). The relationship between PSD-95 clustering and spine stability in vivo. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *34*(6), 2075-2086. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3353-13.2014

Carmona, B., Marinho, H. S., Matos, C. L., Nolasco, S., & Soares, H. (2023). Tubulin Post-Translational Modifications: The Elusive Roles of Acetylation. *Biology*, *12*(4), 561. https://doi.org/10.3390/biology12040561

Catarino, T., Ribeiro, L., Santos, S. D., & Carvalho, A. L. (2013). Regulation of synapse composition by protein acetylation: The role of acetylated cortactin. *Journal of Cell Science*, *126*(Pt 1), 149-162. https://doi.org/10.1242/jcs.110742

Cercato, M. C., Vázquez, C. A., Kornisiuk, E., Aguirre, A. I., Colettis, N., Snitcofsky, M., Jerusalinsky, D. A., & Baez, M. V. (2017). GluN1 and GluN2A NMDA Receptor Subunits Increase in the Hippocampus during Memory Consolidation in the Rat. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *10*. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2016.00242

Cesca, F., Baldelli, P., Valtorta, F., & Benfenati, F. (2010). The synapsins: Key actors of synapse function and plasticity. *Progress in Neurobiology*, *91*(4), 313-348. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.04.006

Cheng, K.-C., Hwang, Y.-L., & Chiang, H.-C. (2022). The double-edged sword effect of HDAC6 in Aβ toxicities. *The FASEB Journal*, *36*(1), e22072. https://doi.org/10.1096/fj.202101061R

Chimenti, F., Bizzarri, B., Maccioni, E., Secci, D., Bolasco, A., Chimenti, P., Fioravanti, R., Granese, A., Carradori, S., Tosi, F., Ballario, P., Vernarecci, S., & Filetici, P. (2009). A Novel Histone Acetyltransferase Inhibitor Modulating Gcn5 Network: Cyclopentylidene-[4-(4′-chlorophenyl)thiazol-2-yl)hydrazone. *Journal of Medicinal Chemistry*, *52*(2), 530-536. https://doi.org/10.1021/jm800885d

Chu, C.-W., Hou, F., Zhang, J., Phu, L., Loktev, A. V., Kirkpatrick, D. S., Jackson, P. K., Zhao, Y., & Zou, H. (2011). A novel acetylation of β-tubulin by San modulates microtubule polymerization via down-regulating tubulin incorporation. *Molecular Biology of the Cell*, *22*(4), 448-456. https://doi.org/10.1091/mbc.E10-03-0203

Clavet-Fournier, V., Lee, C., Wegner, W., Brose, N., Rhee, J., & Willig, K. I. (2023). *Pre- and postsynaptic nanostructures increase in size and complexity after LTP induction* (p. 2023.02.09.527812). bioRxiv. https://doi.org/10.1101/2023.02.09.527812

Conacci-Sorrell, M., Ngouenet, C., & Eisenman, R. N. (2010). Myc-Nick: A Cytoplasmic Cleavage Product of Myc that Promotes α-Tubulin Acetylation and Cell Differentiation. *Cell*, *142*(3), 480-493. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.037

Costi, R., Di Santo, R., Artico, M., Miele, G., Valentini, P., Novellino, E., & Cereseto, A. (2007). Cinnamoyl Compounds as Simple Molecules that Inhibit p300 Histone Acetyltransferase. *Journal of Medicinal Chemistry*, *50*(8), 1973-1977. https://doi.org/10.1021/jm060943s

Creppe, C., Malinouskaya, L., Volvert, M.-L., Gillard, M., Close, P., Malaise, O., Laguesse, S., Cornez, I., Rahmouni, S., Ormenese, S., Belachew, S., Malgrange, B., Chapelle, J.-P., Siebenlist, U., Moonen, G., Chariot, A., & Nguyen, L. (2009). Elongator Controls the Migration and Differentiation of Cortical Neurons through Acetylation of α-Tubulin. *Cell*, *136*(3), 551-564. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.043

Cueva, J. G., Hsin, J., Huang, K. C., & Goodman, M. B. (2012). Posttranslational Acetylation of α-Tubulin Constrains Protofilament Number in Native Microtubules. *Current Biology*, *22*(12), 1066-1074. https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.05.012

Dagnas, M., Micheau, J., Decorte, L., Beracochea, D., & Mons, N. (2015). Post-training, intrahippocampal HDAC inhibition differentially impacts neural circuits underlying spatial memory in adult and aged mice. *Hippocampus*, *25*(7), 827-837. https://doi.org/10.1002/hipo.22406

Dama, D., & Sharma, S. K. (2024). *Crebinostat Facilitates Memory Formation* [Preprint]. Neuroscience. https://doi.org/10.1101/2024.02.05.578875

Davie, J. R. (2003). Inhibition of Histone Deacetylase Activity by Butyrate. *The Journal of Nutrition*, *133*(7), 2485S-2493S. https://doi.org/10.1093/jn/133.7.2485S

Delint-Ramírez, I., Salcedo-Tello, P., & Bermudez-Rattoni, F. (2008). Spatial memory formation induces recruitment of NMDA receptor and PSD-95 to synaptic lipid rafts. *Journal of Neurochemistry*, *106*(4), 1658-1668. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05523.x

Dosemeci, A., Makusky, A. J., Jankowska-Stephens, E., Yang, X., Slotta, D. J., & Markey, S. P. (2007). Composition of the synaptic PSD-95 complex. *Molecular &*

Cellular Proteomics: MCP, *6*(10), 1749-1760. https://doi.org/10.1074/mcp.M700040-MCP200

Drazic, A., Myklebust, L. M., Ree, R., & Arnesen, T. (2016). The world of protein acetylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, *1864*(10), 1372-1401. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.06.007

Ehrlich, I., Klein, M., Rumpel, S., & Malinow, R. (2007). PSD-95 is required for activity-driven synapse stabilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(10), 4176-4181. https://doi.org/10.1073/pnas.0609307104

Ehrlich, I., & Malinow, R. (2004). Postsynaptic Density 95 controls AMPA Receptor Incorporation during Long-Term Potentiation and Experience-Driven Synaptic Plasticity. *The Journal of Neuroscience*, *24*(4), 916-927. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4733-03.2004

Espallergues, J., Teegarden, S. L., Veerakumar, A., Boulden, J., Challis, C., Jochems, J., Chan, M., Petersen, T., Deneris, E., Matthias, P., Hahn, C.-G., Lucki, I., Beck, S. G., & Berton, O. (2012). HDAC6 Regulates Glucocorticoid Receptor Signaling in Serotonin Pathways with Critical Impact on Stress Resilience. *The Journal of Neuroscience*, *32*(13), 4400-4416. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5634-11.2012

Esquivel, M. L. (2017). *Rol de la acetilación sináptica en la consolidación de la memoria de largo término de evitación inhibitoria, en el hipocampo de ratón* [Tesina de licenciatura]. Universidad de Buenos Aires.

Fanara, P., Husted, K. H., Selle, K., Wong, P.-Y. A., Banerjee, J., Brandt, R., & Hellerstein, M. K. (2010). Changes in microtubule turnover accompany synaptic plasticity and memory formation in response to contextual fear conditioning in mice. *Neuroscience*, *168*(1), 167-178. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.03.031

Fanselow, Michael S. (1990). Factors governing one-trial contextual conditioning. *Animal Learning and Behavior*, *18*(3), 264-270.

Federman, N., De La Fuente, V., Zalcman, G., Corbi, N., Onori, A., Passananti, C., & Romano, A. (2013). Nuclear Factor κB-Dependent Histone Acetylation is Specifically Involved in Persistent Forms of Memory. *The Journal of Neuroscience*, *33*(17), 7603-7614. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4181-12.2013

Fitzgerald, P. J., Pinard, C. R., Camp, M. C., Feyder, M., Sah, A., Bergstrom, H. C., Graybeal, C., Liu, Y., Schlüter, O. M., Grant, S. G., Singewald, N., Xu, W., & Holmes, A. (2015). Durable fear memories require PSD-95. *Molecular Psychiatry*, *20*(7), 901-912. https://doi.org/10.1038/mp.2014.161

Fontán-Lozano, Á., Romero-Granados, R., Troncoso, J., Múnera, A., Delgado-García, J. M., & Carrión, Á. M. (2008). Histone deacetylase inhibitors improve learning consolidation in young and in KA-induced-neurodegeneration and SAMP-8-mutant mice. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *39*(2), 193-201. https://doi.org/10.1016/j.mcn.2008.06.009

Freudenthal, R., Boccia, M. M., Acosta, G. B., Blake, M. G., Merlo, E., Baratti, C. M., & Romano, A. (2005). NF-κB transcription factor is required for inhibitory avoidance

long-term memory in mice. *European Journal of Neuroscience*, *21*(10), 2845-2852. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04126.x

Glowinski, J., & Iversen, L. L. (1966). Regional Studies of Catecholamines in the Rat Brain-I. *Journal of Neurochemistry*, *13*(8), 655-669. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1966.tb09873.x

Govindarajan, N., Rao, P., Burkhardt, S., Sananbenesi, F., Schlüter, O. M., Bradke, F., Lu, J., & Fischer, A. (2013). Reducing HDAC6 ameliorates cognitive deficits in a mouse model for Alzheimer's disease. *EMBO Molecular Medicine*, *5*(1), 52-63. https://doi.org/10.1002/emmm.201201923

Harting, F. (2022). *DHARMa: Residual Diagnostics for Hierarchical (Multi-Level / Mixed) Regression Models* (R package version 0.4.6) [Software]. https://CRAN.R-project.org/package=DHARMa

Hawk, J. D., Florian, C., & Abel, T. (2011). Post-training intrahippocampal inhibition of class I histone deacetylases enhances long-term object-location memory. *Learning & Memory*, *18*(6), 367-370. https://doi.org/10.1101/lm.2097411

Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X.-F., & Yao, T.-P. (2002). HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*, *417*(6887), 455-458. https://doi.org/10.1038/417455a

Igaz, L. M., Vianna, M. R. M., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2002). Two Time Periods of Hippocampal mRNA Synthesis Are Required for Memory Consolidation of Fear-Motivated Learning. *The Journal of Neuroscience*, *22*(15), 6781-6789. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-15-06781.2002

Ito, S., Horikawa, S., Suzuki, T., Kawauchi, H., Tanaka, Y., Suzuki, T., & Suzuki, T. (2014). Human NAT10 Is an ATP-dependent RNA Acetyltransferase Responsible for N4-Acetylcytidine Formation in 18 S Ribosomal RNA (rRNA). *Journal of Biological Chemistry*, *289*(52), 35724-35730. https://doi.org/10.1074/jbc.C114.602698

Izquierdo, I., Bevilaqua, L. R. M., Rossato, J. I., Bonini, J. S., Medina, J. H., & Cammarota, M. (2006). Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends in Neurosciences*, *29*(9), 496-505. https://doi.org/10.1016/j.tins.2006.07.005

Jaworski, J., Kapitein, L. C., Gouveia, S. M., Dortland, B. R., Wulf, P. S., Grigoriev, I., Camera, P., Spangler, S. A., Di Stefano, P., Demmers, J., Krugers, H., Defilippi, P., Akhmanova, A., & Hoogenraad, C. C. (2009). Dynamic Microtubules Regulate Dendritic Spine Morphology and Synaptic Plasticity. *Neuron*, *61*(1), 85-100. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.11.013

Jiao, Y., Fan, H., Wang, K., & Lu, S. (2019). Sevoflurane Impairs Short-Term Memory by Affecting PSD-95 and AMPA Receptor in the Hippocampus of a Mouse Model. *Behavioural Neurology*, *2019*, e1068260. https://doi.org/10.1155/2019/1068260

Jochems, J., Boulden, J., Lee, B. G., Blendy, J. A., Jarpe, M., Mazitschek, R., Van Duzer, J. H., Jones, S., & Berton, O. (2014). Antidepressant-Like Properties of Novel HDAC6-Selective Inhibitors with Improved Brain Bioavailability. *Neuropsychopharmacology*, *39*(2), 389-400. https://doi.org/10.1038/npp.2013.207

Kaech, S., & Banker, G. (2006). Culturing hippocampal neurons. *Nature Protocols*, *1*(5), 2406-2415. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.356

Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessel, T. M., Siegelbaum, S. A., & Hudspeth, A. J. (2013a). Learning and memory. En *Principles of neural science* (5.ª ed., pp. 1441-1460). McGraw-Hill.

Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessel, T. M., Siegelbaum, S. A., & Hudspeth, A. J. (2013b). Overview of synaptic transmission. En *Principles of neural science* (5.ª ed., pp. 177-188). McGraw-Hill.

Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessel, T. M., Siegelbaum, S. A., & Hudspeth, A. J. (2013c). Synaptic integration in the central nervous system. En *Principles of neural science* (5.ª ed., pp. 210-235). McGraw-Hill.

Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessel, T. M., Siegelbaum, S. A., & Hudspeth, A. J. (2013d). Transmitter release. En *Principles of neural science* (5.ª ed., pp. 260-288). McGraw-Hill.

Kim, E., & Sheng, M. (2004). PDZ domain proteins of synapses. *Nature Reviews Neuroscience*, *5*(10), 771-781. https://doi.org/10.1038/nrn1517

Knowlton, B. J., & Fanselow, M. S. (1998). The hippocampus, consolidation and on-line memory. *Current Opinion in Neurobiology*, *8*(2), 293-296. https://doi.org/10.1016/S0959-4388(98)80154-2

Kovacs, J. J., Murphy, P. J. M., Gaillard, S., Zhao, X., Wu, J.-T., Nicchitta, C. V., Yoshida, M., Toft, D. O., Pratt, W. B., & Yao, T.-P. (2005). HDAC6 Regulates Hsp90 Acetylation and Chaperone-Dependent Activation of Glucocorticoid Receptor. *Molecular Cell*, *18*(5), 601-607. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.04.021

Kuznetsova, A., Brockhoff, P. B., & Christensen, R. H. B. (2017). "lmerTest Package: Tests in Linear Mixed Effects Models." *Journal of Statistical Software*, *82*(13), 1-26. https://doi.org/doi:10.18637/jss.v082.i13

Larrieu, D., Britton, S., Demir, M., Rodriguez, R., & Jackson, S. P. (2014). Chemical Inhibition of NAT10 Corrects Defects of Laminopathic Cells. *Science*, *344*(6183), 527-532. https://doi.org/10.1126/science.1252651

Lautz, J. D., Gniffke, E. P., Brown, E. A., Immendorf, K. B., Mendel, R. D., & Smith, S. E. P. (2019). Activity-dependent changes in synaptic protein complex composition are consistent in different detergents despite differential solubility. *Scientific Reports*, *9*(1), 10890. https://doi.org/10.1038/s41598-019-46690-y

Lee, G., & Rook, S. L. (1992). Expression of tau protein in non-neuronal cells: Microtubule binding and stabilization. *Journal of Cell Science*, *102 (Pt 2)*, 227-237. https://doi.org/10.1242/jcs.102.2.227

Lee, J. S., Kim, M.-H., Ho, W.-K., & Lee, S.-H. (2008). Presynaptic Release Probability and Readily Releasable Pool Size Are Regulated by Two Independent Mechanisms during Posttetanic Potentiation at the Calyx of Held Synapse. *Journal of Neuroscience*, *28*(32), 7945-7953. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2165-08.2008

Lenth, R. (2023). *emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means* (R package version 1.8.9) [Software]. https://CRAN.R-project.org/package=emmeans

Levenson, J. M., O'Riordan, K. J., Brown, K. D., Trinh, M. A., Molfese, D. L., & Sweatt, J. D. (2004). Regulation of Histone Acetylation during Memory Formation in the Hippocampus *. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(39), 40545-40559. https://doi.org/10.1074/jbc.M402229200

Liu, F., Yan, W., Chen, C., Zeng, Y., Kong, Y., He, X., Pei, P., Wang, S., & Zhang, T. (2024). Acetylome analyses provide novel insights into the effects of chronic intermittent hypoxia on hippocampus-dependent cognitive impairment. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *17*. https://doi.org/10.3389/fnmol.2024.1324458

Liu, N., Xiong, Y., Li, S., Ren, Y., He, Q., Gao, S., Zhou, J., & Shui, W. (2015). New HDAC6-mediated deacetylation sites of tubulin in the mouse brain identified by quantitative mass spectrometry. *Scientific Reports*, *5*(1), 16869. https://doi.org/10.1038/srep16869

Lopez-Atalaya, J. P., & Barco, A. (2014). Can changes in histone acetylation contribute to memory formation? *Trends in Genetics: TIG*, *30*(12), 529-539. https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.09.003

LoPresti, P. (2020). HDAC6 in Diseases of Cognition and of Neurons. *Cells*, *10*(1), 12. https://doi.org/10.3390/cells10010012

Lynch, M. A. (2004). Long-Term Potentiation and Memory. *Physiological Reviews*, *84*(1), 87-136. https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2003

Maddox, S. A., Watts, C. S., Doyère, V., & Schafe, G. E. (2013). A Naturally-Occurring Histone Acetyltransferase Inhibitor Derived from Garcinia indica Impairs Newly Acquired and Reactivated Fear Memories. *PLoS ONE*, *8*(1), e54463. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054463

Maddox, S. A., Watts, C. S., & Schafe, G. E. (2013). P300/CBP histone acetyltransferase activity is required for newly acquired and reactivated fear memories in the lateral amygdala. *Learning & Memory*, *20*(2), 109-119. https://doi.org/10.1101/lm.029157.112

Matsuyama, A., Shimazu, T., Sumida, Y., Saito, A., Yoshimatsu, Y., Seigneurin-Berny, D., Osada, H., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., Horinouchi, S., & Yoshida, M. (2002). In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *The EMBO Journal*, *21*(24), 6820-6831. https://doi.org/10.1093/emboj/cdf682

McIntyre, C. K., Power, A. E., Roozendaal, B., & McGAUGH, J. L. (2003). Role of the Basolateral Amygdala in Memory Consolidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *985*(1), 273-293. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb07088.x

Merriam, E. B., Millette, M., Lumbard, D. C., Saengsawang, W., Fothergill, T., Hu, X., Ferhat, L., & Dent, E. W. (2013). Synaptic regulation of microtubule dynamics in dendritic spines by calcium, F-actin, and drebrin. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *33*(42), 16471-16482. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0661-13.2013

Merschbaecher, K., Hatko, L., Folz, J., & Mueller, U. (2016). Inhibition of different histone acetyltransferases (HATs) uncovers transcription-dependent and -independent acetylation-mediated mechanisms in memory formation. *Learning & Memory*, *23*(2), 83-89. https://doi.org/10.1101/lm.039438.115

Migaud, M., Charlesworth, P., Dempster, M., Webster, L. C., Watabe, A. M., Makhinson, M., He, Y., Ramsay, M. F., Morris, R. G. M., Morrison, J. H., O'Dell, T. J., & Grant, S. G. N. (1998). Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature*, *396*(6710), 433-439. https://doi.org/10.1038/24790

Mitsuyama, F., Futatsugi, Y., Okuya, M., Karagiozov, K., Kato, Y., Kanno, T., Sano, H., & Koide, T. (2008). Microtubules to form memory. *Italian Journal of Anatomy and Embryology = Archivio Italiano Di Anatomia Ed Embriologia*, *113*(4), 227-235.

Miyake, Y., Keusch, J. J., Wang, L., Saito, M., Hess, D., Wang, X., Melancon, B. J., Helquist, P., Gut, H., & Matthias, P. (2016). Structural insights into HDAC6 tubulin deacetylation and its selective inhibition. *Nature Chemical Biology*, *12*(9), 748-754. https://doi.org/10.1038/nchembio.2140

Molnár, E. (2011). Long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *22*(5), 506-513. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2011.07.017

Narita, T., Weinert, B. T., & Choudhary, C. (2019). Functions and mechanisms of non-histone protein acetylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *20*(3), 156-174. https://doi.org/10.1038/s41580-018-0081-3

Nieuwenhuis, I. L. C., & Takashima, A. (2011). The role of the ventromedial prefrontal cortex in memory consolidation. *Behavioural Brain Research*, *218*(2), 325-334. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.12.009

North, B. J., Marshall, B. L., Borra, M. T., Denu, J. M., & Verdin, E. (2003). The Human Sir2 Ortholog, SIRT2, Is an NAD+-Dependent Tubulin Deacetylase. *Molecular Cell*, *11*(2), 437-444. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00038-8

Ohkawa, N., Sugisaki, S., Tokunaga, E., Fujitani, K., Hayasaka, T., Setou, M., & Inokuchi, K. (2008). N-acetyltransferase ARD1-NAT1 regulates neuronal dendritic development. *Genes to Cells*, *13*(11), 1171-1183. https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2008.01235.x

O'Keefe, J., & Nadel, L. (1978). The anatomy. En *The hippocamus as a cognitive map* (pp. 103-140). Oxford Uninversity Press.

Pandey, K., Sharma, K. P., & Sharma, S. K. (2015). Histone deacetylase inhibition facilitates massed pattern-induced synaptic plasticity and memory. *Learning & Memory*, *22*(10), 514-518. https://doi.org/10.1101/lm.039289.115

Pandey, K., & Sharma, S. K. (2020). Activity- and memory training-induced acetylation of α-tubulin in the hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory*, *171*, 107226. https://doi.org/10.1016/j.nlm.2020.107226

Parato, J., & Bartolini, F. (2021). The microtubule cytoskeleton at the synapse. *Neuroscience Letters*, *753*, 135850. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.135850

Paré, D. (2003). Role of the basolateral amygdala in memory consolidation. *Progress in Neurobiology*, *70*(5), 409-420. https://doi.org/10.1016/S0301-0082(03)00104-7

Paré, W. (1961). The effect of caffine and seconal on a visual discrimination task. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *54*(5), 506-509. https://doi.org/10.1037/h0040683

Paxinos, G., & Franklin, K. B. J. (2019). *Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press.

Pedersen, T. (2024). *patchwork: The Composer of Plots* (R package version 1.2.0) [Software]. https://CRAN.R-project.org/package=patchwork

Peixoto, L., & Abel, T. (2013). The Role of Histone Acetylation in Memory Formation and Cognitive Impairments. *Neuropsychopharmacology*, *38*(1), 62-76. https://doi.org/10.1038/npp.2012.86

Penney, J., & Tsai, L.-H. (2014). Histone deacetylases in memory and cognition. *Science Signaling*, *7*(355). https://doi.org/10.1126/scisignal.aaa0069

Perry, S., Kiragasi, B., Dickman, D., & Ray, A. (2017). The Role of Histone Deacetylase 6 in Synaptic Plasticity and Memory. *Cell Reports*, *18*(6), 1337-1345. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.028

Petrucci, T. C., & Morrow, J. S. (1987). Synapsin I: An actin-bundling protein under phosphorylation control. *The Journal of Cell Biology*, *105*(3), 1355-1363. https://doi.org/10.1083/jcb.105.3.1355

Roesler, R., Vianna, M., Sant'Anna, M. K., Kuyven, C. R., Kruel, A. V., Quevedo, J., & Ferreira, M. B. (1998). Intrahippocampal infusion of the NMDA receptor antagonist AP5 impairs retention of an inhibitory avoidance task: Protection from impairment by pretraining or preexposure to the task apparatus. *Neurobiology of Learning and Memory*, *69*(2), 87-91. https://doi.org/10.1006/nlme.1997.3810

Rosa, J., de Carvalho Myskiw, J., Fiorenza, N. G., Furini, C. R. G., Sapiras, G. G., & Izquierdo, I. (2023). Hippocampal cholinergic receptors and the mTOR participation in fear-motivated inhibitory avoidance extinction memory. *Behavioural Brain Research*, *437*, 114129. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2022.114129

Rossato, J. I., Bonini, J. S., Coitinho, A. S., Vianna, M. R. M., Medina, J. H., Cammarota, M., & Izquierdo, I. (2004). Retrograde Amnesia Induced by Drugs Acting on Different Molecular Systems. *Behavioral Neuroscience*, *118*(3), 563-568. https://doi.org/10.1037/0735-7044.118.3.563

Salles, A., Boccia, M., Blake, M., Corbi, N., Passananti, C., Baratti, C. M., Romano, A., & Freudenthal, R. (2015). Hippocampal dynamics of synaptic NF-kappa B during inhibitory avoidance long-term memory consolidation in mice. *Neuroscience*, *291*, 70-80. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.01.063

Salles, A., Krawczyk, M. D. C., Blake, M., Romano, A., Boccia, M. M., & Freudenthal, R. (2017). Requirement of NF-kappa B Activation in Different Mice Brain Areas during Long-Term Memory Consolidation in Two Contextual One-Trial Tasks with Opposing Valences. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *10*. https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00104

Saunders, H. A. J., Johnson-Schlitz, D. M., Jenkins, B. V., Volkert, P. J., Yang, S. Z., & Wildonger, J. (2022). Acetylated α-tubulin K394 regulates microtubule stability to shape the growth of axon terminals. *Current Biology: CB*, *32*(3), 614-630.e5. https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.12.012

Schafe, G. E., & LeDoux, J. E. (2000). Memory Consolidation of Auditory Pavlovian Fear Conditioning Requires Protein Synthesis and Protein Kinase A in the Amygdala. *The Journal of Neuroscience*, *20*(18), RC96-RC96. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-18-j0003.2000

Scharf, M. T., Woo, N. H., Lattal, K. M., Young, J. Z., Nguyen, P. V., & Abel, T. (2002). Protein synthesis is required for the enhancement of long-term potentiation and long-term memory by spaced training. *Journal of Neurophysiology*, *87*(6), 2770-2777. https://doi.org/10.1152/jn.2002.87.6.2770

Schätzle, P., Esteves Da Silva, M., Tas, R. P., Katrukha, E. A., Hu, H. Y., Wierenga, C. J., Kapitein, L. C., & Hoogenraad, C. C. (2018). Activity-Dependent Actin Remodeling at the Base of Dendritic Spines Promotes Microtubule Entry. *Current Biology*, *28*(13), 2081-2093.e6. https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.004

Selenica, M.-L., Benner, L., Housley, S. B., Manchec, B., Lee, D. C., Nash, K. R., Kalin, J., Bergman, J. A., Kozikowski, A., Gordon, M. N., & Morgan, D. (2014). Histone deacetylase 6 inhibition improves memory and reduces total tau levels in a mouse model of tau deposition. *Alzheimer's Research & Therapy*, *6*(1), 12. https://doi.org/10.1186/alzrt241

Shang, S., Liu, J., & Hua, F. (2022). Protein acylation: Mechanisms, biological functions and therapeutic targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *7*(1), 396. https://doi.org/10.1038/s41392-022-01245-y

Shen, Q., Zheng, X., McNutt, M. A., Guang, L., Sun, Y., Wang, J., Gong, Y., Hou, L., & Zhang, B. (2009). NAT10, a nucleolar protein, localizes to the midbody and regulates cytokinesis and acetylation of microtubules. *Experimental Cell Research*, *315*(10), 1653-1667. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.03.007

Shen, S., Svoboda, M., Zhang, G., Cavasin, M. A., Motlova, L., McKinsey, T. A., Eubanks, J. H., Bařinka, C., & Kozikowski, A. P. (2020). Structural and in Vivo Characterization of Tubastatin A, a Widely Used Histone Deacetylase 6 Inhibitor. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, *11*(5), 706-712. https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.9b00560

Shida, T., Cueva, J. G., Xu, Z., Goodman, M. B., & Nachury, M. V. (2010). The major alpha-tubulin K40 acetyltransferase alphaTAT1 promotes rapid ciliogenesis and efficient mechanosensation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(50), 21517-21522. https://doi.org/10.1073/pnas.1013728107

Shrimp, J. H., Jing, Y., Gamage, S. T., Nelson, K. M., Han, J., Bryson, K. M., Montgomery, D. C., Thomas, J. M., Nance, K. D., Sharma, S., Fox, S. D., Andressen, T., Sinclair, W. R., Wu, H., Allali-Hassani, A., Senisterra, G., Vedadi, M., Lafontaine, D., Dahlin, J. L., … Meier, J. L. (2021). Remodelin Is a Cryptic Assay Interference Chemotype That Does Not Inhibit NAT10-Dependent Cytidine Acetylation. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, *12*(6), 887-892. https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.0c00193

Shumyatsky, G. P., Malleret, G., Shin, R.-M., Takizawa, S., Tully, K., Tsvetkov, E., Zakharenko, S. S., Joseph, J., Vronskaya, S., Yin, D., Schubart, U. K., Kandel, E. R., & Bolshakov, V. Y. (2005). Stathmin, a Gene Enriched in the Amygdala, Controls Both Learned and Innate Fear. *Cell*, *123*(4), 697-709. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.038

Southwood, C. M., Peppi, M., Dryden, S., Tainsky, M. A., & Gow, A. (2007). Microtubule deacetylases, SirT2 and HDAC6, in the nervous system. *Neurochemical Research*, *32*(2), 187-195. https://doi.org/10.1007/s11064-006-9127-6

Squire, L. R., Genzel, L., Wixted, J. T., & Morris, R. G. (2015). Memory Consolidation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *7*(8), a021766. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021766

Stein, V., House, D. R. C., Bredt, D. S., & Nicoll, R. A. (2003). Postsynaptic Density-95 Mimics and Occludes Hippocampal Long-Term Potentiation and Enhances Long-Term Depression. *Journal of Neuroscience*, *23*(13), 5503-5506. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-13-05503.2003

Stratton, L. O., & Petrinovich, L. (1963). Post-trial injections of an anti-cholinesterase drug and maze learning in two strains of rats. *Psychopharmacologia*, *5*(1), 47-54. https://doi.org/10.1007/BF00405574

Sun, J., Liu, Q., Lv, L., Sun, R., Li, Z. P., Huang, B., Cui, K., & Shi, D. (2021). HDAC6 Is Involved in the Histone Deacetylation of In Vitro Maturation Oocytes and the Reprogramming of Nuclear Transplantation in Pig. *Reproductive Sciences*, *28*(9), 2630-2640. https://doi.org/10.1007/s43032-021-00533-2

Swanger, S. A., Chen, W., Wells, G., Burger, P. B., Tankovic, A., Bhattacharya, S., Strong, K. L., Hu, C., Kusumoto, H., Zhang, J., Adams, D. R., Millichap, J. J., Petrovski, S., Traynelis, S. F., & Yuan, H. (2016). Mechanistic Insight into NMDA Receptor Dysregulation by Rare Variants in the GluN2A and GluN2B Agonist Binding Domains. *American Journal of Human Genetics*, *99*(6), 1261-1280. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.10.002

Sweatt, J. D. (2010). The basics of psychological learning and memory theory. En *Mechanisms of memory* (2.ª ed., pp. 3-23). Academic Press.

Sweet, E. S., Previtera, M. L., Fernández, J. R., Charych, E. I., Tseng, C.-Y., Kwon, M., Starovoytov, V., Zheng, J. Q., & Firestein, B. L. (2011). PSD-95 Alters Microtubule Dynamics via an Association With EB3. *The Journal of Neuroscience*, *31*(3), 1038-1047. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1205-10.2011

Tas, R. P., Chazeau, A., Cloin, B. M. C., Lambers, M. L. A., Hoogenraad, C. C., & Kapitein, L. C. (2017). Differentiation between Oppositely Oriented Microtubules Controls Polarized Neuronal Transport. *Neuron*, *96*(6), 1264-1271.e5. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.11.018

Trzeciakiewicz, H., Ajit, D., Tseng, J.-H., Chen, Y., Ajit, A., Tabassum, Z., Lobrovich, R., Peterson, C., Riddick, N. V., Itano, M. S., Tripathy, A., Moy, S. S., Lee, V. M. Y., Trojanowski, J. Q., Irwin, D. J., & Cohen, T. J. (2020). An HDAC6-dependent surveillance mechanism suppresses tau-mediated neurodegeneration and cognitive decline. *Nature Communications*, *11*(1), 5522. https://doi.org/10.1038/s41467-020-19317-4

Valiati, F. E., Vasconcelos, M., Lichtenfels, M., Petry, F. S., De Almeida, R. M. M., Schwartsmann, G., Schröder, N., De Farias, C. B., & Roesler, R. (2017). Administration of a Histone Deacetylase Inhibitor into the Basolateral Amygdala Enhances Memory Consolidation, Delays Extinction, and Increases Hippocampal BDNF Levels. *Frontiers in Pharmacology*, *8*, 415. https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00415

Varga, J. K., Diffley, K., Leng, K. R. W., Fierke, C. A., & Schueler-Furman, O. (2021). Structure-Based Prediction of KDAC6 Substrates Validated by Enzymatic Assay Reveals Determinants of Promiscuity and Detects New Potential Substrates. *SSRN Electronic Journal*. https://doi.org/10.2139/ssrn.3796492

Vecsey, C. G., Hawk, J. D., Lattal, K. M., Stein, J. M., Fabian, S. A., Attner, M. A., Cabrera, S. M., McDonough, C. B., Brindle, P. K., Abel, T., & Wood, M. A. (2007). Histone Deacetylase Inhibitors Enhance Memory and Synaptic Plasticity via CREB: CBP-Dependent Transcriptional Activation. *Journal of Neuroscience*, *27*(23), 6128-6140. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0296-07.2007

Vickers, C. A., Stephens, B., Bowen, J., Arbuthnott, G. W., Grant, S. G. N., & Ingham, C. A. (2006). Neurone specific regulation of dendritic spines in vivo by post synaptic density 95 protein (PSD-95). *Brain Research*, *1090*(1), 89-98. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.03.075

Villain, H., Florian, C., & Roullet, P. (2016). HDAC inhibition promotes both initial consolidation and reconsolidation of spatial memory in mice. *Scientific Reports*, *6*(1), 27015. https://doi.org/10.1038/srep27015

Waites, C., Qu, X., & Bartolini, F. (2021). The synaptic life of microtubules. *Current Opinion in Neurobiology*, *69*, 113-123. https://doi.org/10.1016/j.conb.2021.03.004

Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag. https://ggplot2.tidyverse.org

Wiltgen, B. J., Sanders, M. J., Behne, N. S., & Fanselow, M. S. (2001). Sex differences, context preexposure, and the immediate shock deficit in Pavlovian context conditioning with mice. *Behavioral Neuroscience*, *115*(1), 26-32. https://doi.org/10.1037/0735-7044.115.1.26

Zhang, X., Yuan, Z., Zhang, Y., Yong, S., Salas-Burgos, A., Koomen, J., Olashaw, N., Parsons, J. T., Yang, X.-J., Dent, S. R., Yao, T.-P., Lane, W. S., & Seto, E. (2007). HDAC6 Modulates Cell Motility by Altering the Acetylation Level of Cortactin. *Molecular Cell*, *27*(2), 197-213. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.05.033

Zhang, Y., Li, N., Caron, C., Matthias, G., Hess, D., Khochbin, S., & Matthias, P. (2003). HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *The EMBO Journal*, *22*(5), 1168-1179. https://doi.org/10.1093/emboj/cdg115

Zhao, Z., Xu, H., & Gong, W. (2010). Histone Deacetylase 6 (HDAC6) Is an Independent Deacetylase for α-Tubulin. *Protein & Peptide Letters*, *17*(5), 555-558.

Apéndices

7.1 Abreviaturas

NMDA: ácido N-metil-D-aspártico

AMPA: ácido α-amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

PSD: densidad posináptica

PSD95: Proteína de la densidad posináptica 95

KAT/HAT: acetiltransferasa de lisina

KDAC/HDAC: deacetilasa de lisina

KDAC6: deacetilasa de lisina 6

H2 / H3 / H4: histona 2 / histona3 / histona4

NAD^+: nicotinamida adenina dinucleótido

NaB: butirato de sodio

TSA. Tricostatina A

TubA: Tubastatina A

IC50: concentración inhibitoria del 50%

Hi2: inhibidor de HAT-2

Re: Remodelina

IP: intraperitoneal

MWM: laberinto acuático de Morris

NOR: tarea de reconocimiento de objeto novedoso

EI: evitación inhibitoria

SI: shock inmediato

SD: shock débil

SF: shock fuerte

HT: extracto homogenato total

eDPS: extracto enriquecido en densidades posinápticas

LDS: dodecilsulfato de litio

GLM: modelos lineales generalizados

GLMM: modelos lineales generalizados mixtos

MME: media marginal estimada (de un modelo GLM o GLMM)

ARN: ácido ribonucleico

ADN: ácido desoxiribonucleico

MT: microtúbulo

MAP: proteína asociada a los microtúbulos

LTP: potenciación de largo término

LTPq: potenciación de largo término inducida químicamente

AcLys: lisinas acetiladas

Syn: sinapsina

DIV: días *in vitro*

7.2 Índice de figuras

Figura 1: Representación del hipocampo de la rata 8

Figura 2: Estructura de la densidad posináptica en sinapsis excitatorias 9

Figura 3: Organización de los dominios funcionales de KDAC6 15

Figura 4: La Tubastatina A no altera la conducta de animales que no están consolidando una memoria 25

Figura 5: La Tubastatina A facilita la memoria de largo término cuando se administra inmediatamente después del entrenamiento, pero no 3 h después 26

Figura 6: La administración intrahipocampal de Tubastatina A es suficiente para facilitar la consolidación de la memoria de EI 27
Figura 7: La remodelina facilita la consolidación de la memoria de EI mientras que el Hi2 no muestra efecto 29
Figura 8: La Remodelina no altera los niveles de AcLys, acetil-α-tubulina ni acetil-H3 en el hipocampo de ratón 45 minutos luego de su administración 31
Figura 9: Los microtúbulos son estructuras dinámicas 36
Figura 10: Representación estructural de la tubulina de ratón mostrando la distribución de lisinas acetilables identificadas 38
Figura 11: La señal de AcLys se superpone con la señal de α-tubulina 45
Figura 12: El tratamiento con TSA y TubA preserva la acetilación de tubulina en extractos hipocampales, pero no así el NaB 46
Figura 13: La TubA administrada de forma intraperitoneal es capaz de modular los niveles de acetilación de tubulina 48
Figura 14: Niveles de tubulina acetilada, histona acetilada y PSD95, 15 minutos después del entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria 49
Figura 15: Niveles de tubulina acetilada, histona acetilada y PSD95, 45 minutos después del entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria 51
Figura 16: El entrenamiento fuerte de EI induce, a los 45 minutos, un aumento en los niveles de AcLys, pero no de acetil-α-tubulina 52
Figura 17: Punctas o partículas en inmunofluorescencias 62
Figura 18: El anticuerpo anti-AcLys detecta una banda alrededor de 55 kDa que coincide con la banda de acetil-α-tubulina (K40) y α-tubulina 64
Figura 19: Las neuronas hipocampales sometidas a LTPq muestran un aumento en la señal de acetilación dendrítica 66
Figura 20: Las neuronas hipocampales sometidas a LTPq muestran un aumento en el número de partículas de PSD95 a 15 y 45 minutos posteriores al estímulo 68
Figura 21: Las neuronas hipocampales sometidas a LTPq no muestran cambios en la señal de la proteína presináptica sinapsina en tiempos posteriores al estímulo respecto al tiempo pretratamiento 71
Figura 22: MME de las densidades de partículas para AcLys, PSD95 y Syn, relativizadas a cada tiempo Pre 72
Figura 23: La señal de AcLys que colocaliza con PSD95 aumenta 15 minutos después de la LTPq 75
Figura 24: La señal de AcLys que colocaliza con Syn no cambia tras la LTP 78
Figura 25: MME de las densidades de partículas de AcLys sináptica, relativizadas a cada tiempo Pre 80