

Tesis Doctoral

Regulación de la expresión de genes de respuesta temprana y tardía en la formación y mantenimiento de la memoria de largo término

Zalcman, Gisela Patricia

2016-09-15

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Zalcman, Gisela Patricia. (2016-09-15). Regulación de la expresión de genes de respuesta temprana y tardía en la formación y mantenimiento de la memoria de largo término. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Zalcman, Gisela Patricia. "Regulación de la expresión de genes de respuesta temprana y tardía en la formación y mantenimiento de la memoria de largo término". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-09-15.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Regulación de la expresión de genes de respuesta temprana y tardía en la formación y mantenimiento de la memoria de largo término.

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

GISELA PATRICIA ZALCMAN

Director de tesis: Dr. Arturo Romano

Director Asistente: Dra. Noel Federman

Consejero de estudios: Dra. Lidia Szczupak

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Neurobiología de la Memoria - Departamento De Fisiología Y Biología Molecular Y Celular - IFIByNE-UBA-CONICET.

Buenos Aires, 2016

Regulación de la expresión de genes de respuesta temprana y tardía en la formación y mantenimiento de la memoria de largo término.

A lo largo de los últimos años, se ha acumulado una vasta evidencia experimental señalando a NF- κ B como uno de los factores de transcripción (FT) más relevantes en la formación y reprocesamiento de memorias de largo término (MLT) en distintos modelos animales y tareas de aprendizaje. Sin embargo, poco se sabe de los genes que son regulados por este FT durante procesos mnésicos. El objetivo de mi tesis fue identificar y caracterizar algunos de los genes que son regulados por este FT durante la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos en el hipocampo de ratón.

Los resultados obtenidos indican que durante este proceso, NF- κ B regula la expresión de genes de respuesta temprana y tardía, en particular, del FT ZIF268 y de la proteína-quinasa Ca(2+)-Calmodulina-quinasa II δ (CaMKII δ), una sub-unidad de CaMKII cuya función en el sistema nervioso central se desconoce. El entrenamiento al paradigma de Reconocimiento de Objetos Novedosos, que lleva a la formación de una memoria de reconocimiento de largo término, indujo la expresión de ambos genes. ZIF268 se expresa de manera rápida y transitoria dentro de las primeras horas post-entrenamiento y su expresión es necesaria para la formación de una MLT. Por el contrario, la expresión de CaMKII δ se induce en forma tardía y sostenida, y persiste hasta por lo menos 7 días luego del entrenamiento. Sorprendentemente, nuestros resultados indican que CaMKII δ no afecta la formación de la MLT, sino la formación y mantenimiento de una forma de MLT más persistente. A continuación, mostramos que la ocupación nucleosomal en ciertas regiones claves del promotor de CaMKII δ se ve afectada hasta 7 días luego del entrenamiento. Esta es la primera vez que se demuestra que este tipo de modificaciones epigenéticas tienen lugar durante la formación y mantenimiento de la MLT. Por último, hallamos que, en neuronas piramidales del hipocampo, CaMKII δ se localiza principalmente en el núcleo, dendritas y terminales pre-sinápticas. Nuestros estudios funcionales, junto con los de localización sub-celular aportan los primeros indicios respecto a los mecanismos moleculares en los que podría intervenir CaMKII δ en el sistema nervioso central.

Palabras Clave: memoria de largo término, consolidación, mantenimiento, epigenética, NF- κ B ZIF268, BDNF, CaMKII δ , nucleosomas.

Regulation of immediate-early and late gene expression in the formation and maintenance of long term memory.

An important body of evidence supports NF-kappaB as one of the most relevant transcription factors (TF) involved in the consolidation of long-term memories (LTM) in different animal models and behavioural tasks. However, little is known about the genes that are regulated by this TF in mnemonic processes. The aim of my PhD research was to identify and characterize some of the genes that are regulated by this TF during the consolidation of object recognition memory in the mouse hippocampus.

The results obtained indicate that during this process NF-kappaB regulates the expression of immediate-early and late genes, which include TF ZIF268 and Calcium-Calmodulin Kinase II δ - (CaMKII δ), an isoform of CaMKII whose precise function in the central nervous system is unknown. Training on the Novel Object Recognition task, which leads to the formation of an object recognition LTM, induced the expression of both genes. Zif268 was expressed rapidly and transiently within the first hours after training and its expression was required for the formation of LTM. On the contrary, CaMKII δ expression was induced in a late and sustained manner, being up-regulated upto 7 days after training. Surprisingly, inhibition of CaMKII δ expression did not affect the formation of LTM, but it impaired the formation and maintenance of a persistent form of LTM. Moreover, we showed that nucleosomal occupancy in certain key regions of CaMKII δ promoter was affected as a result of NOR training upto 7 days later. This is the first evidence that this type of epigenetic modification occurs during the formation and maintenance of LTM. Finally, we found that in hippocampal pyramidal neurons, CaMKII δ is primarily located in the nucleus, dendrites and pre-synaptic terminals. The information on its subcellular-localization together with our functional studies provide the first hint regarding the signaling mechanisms that may be affected by CaMKII δ in the CNS.

Keywords: long-term memory, consolidation, maintenance, epigenetics, NF- κ B, ZIF268, BDNF, CaMKII δ , nucleosomes.

AGRADECIMIENTOS

A mi papá, por haberme respondido con tanto amor y, sobre todo, tanta lógica todas las preguntas que te hice de chiquita...y de grande.

A mi mamá, por haberme enseñado y demostrado que todo lo que me separa de aquello que quiero hacer, es ir, y hacerlo.

A mi abuelo, por enseñarme a trasgredir con todo pre-concepto y a buscar mi propia verdad...siempre que sea lógica, claro!

A Javi, por hacer que la vida sea más divertida! Todos los días! Gracias por todas las veces que te sentaste a mi lado y me acompañaste en las largas horas que estuve escribiendo la Tesis. Gracias por apoyarme en la búsqueda de nuevas oportunidades y hacer de ellas un proyecto en conjunto.

A Joa...que buena compañera de vida! Los recuerdos más importantes que tengo de chiquita, son de cuando naciste...de ahí en más, todos los momentos dulces y amargos compartidos con vos! Gracias por estar siempre.

A Cris, porque sé que me entendiste todas las veces que a pesar de estar cansada, le ponía toda la garra y me ayudaste en el proceso. "Persevera y triunfarás".

A Lili, por haberme inspirado y acompañado en el camino de la ciencia, siempre! Por compartir tus experiencias conmigo y dejarme ser parte de ellas. Te quiero!

A Jim, Ev, Vi, Lu, Flo y Martu. El orden de los factores, no altera el producto! No sería hoy quien soy sin una y cada una de ustedes. Mil millones de charlas y experiencias que formaron mi forma de ser, pensar, sentir, expresarme...y bueno, ya saben que podría seguir enumerando...

A todos mis "gurúes" que me guiaron bien al comienzo, cuando lo único que sabía es que quería estudiar el cerebro pero no sabía por dónde empezar:

A Gonzalo. Por haberle puesto tanta onda a enseñarme, motivarme y guiarme. Gracias por tu tiempo! En ese momento no entendía nada, pero ahora puedo decirte que nada de ello fue en vano!

A Tristán, porque cada vez que terminaba tu clase de "Conociendo el cerebro" me surgían las mil y un preguntas entre neurocientíficas, filosóficas y existenciales y siempre me contestaste TODAS. GRACIAS!

A Diana. Gracias por abrirme las puertas de tu laboratorio en un momento en el que lo mejor que podía aportar era motivación hasta el cansancio.

A Artur, por haberme dado un lugar en tu laboratorio. Tuve el privilegio de tener no solo un jefe que la tiene clarísima y que siempre da en la tecla cada vez que hay un problema, sino que además me enseñó como Profesor todos los días de mi doctorado. Gracias por haber discutido con entusiasmo tantas cuestiones neurocientíficas. Gracias por la seguridad de saber que en tu palabra, iba a encontrar la respuesta. Gracias por haberme permitido proponer, intentar y equivocarme, esos pasos que te dan la libertad e independencia que hacen que uno crezca. Gracias por comprender todo lo que se le pone a uno, de uno, en juego cuando hace ciencia. Gracias por esta linda experiencia.

A Noe. Ponga lo que ponga, me voy a quedar corta! Lo sé, lo sabes! Podría sumarle a la Tesis un capítulo aparte sólo agradeciéndote. Todo me enseñaste. Mi primer animal canulado, mi primer análisis de resultados...Me motivaste SIEMPRE, a ir para adelante, a buscar cosas nuevas...a no quedarme con un NO SE PUEDE. Mil millones de charlas. Siempre los mejores consejos. Sos como mi hermana mayor, y mi jefa, claro. ¿Cuántas risas y lágrimas compartimos juntas? Quichicientas! Te adoro y admiro infinito. GRACIAS!

Y ahora sí, a todos los del LNM, esa comunidad hermosa con la que conviví los últimos siete años:

A los ángeles de Artur! Vero, Cande, Marian, Lei, Sol y Noe. Gracias por todo lo que me enseñaron y por todo lo que compartimos. Por la sana convivencia y por la ayuda y la contención de siempre.

A An, Mari, Nadia, Marcos, Cande y Martin. Sé que me esperan muy buenas experiencias en otros laboratorios, pero estoy convencida de que ninguna va a ser tan linda, íntima y especial como la que tuve en el LNM *con* y *gracias a* ustedes. Gracias por todas las veces que me levantaron el ánimo, por todas las veces que me ayudaron dentro y fuera del labo, por acompañarme en el gusto por la ciencia y en discutir sus bemoles. Los admiro a todos y les deseo la mejor de las suertes y el mejor de los éxitos en el camino que están construyendo, vayan por lo que quieren ser y hacer...y si no deja plata, juntémonos y encontrémosle la vuelta! Ojalá nos esperen muchas mas charlas y congresos juntos. Miramar 20?? Los quiero!

A Flor, Rodri, Emi, Fiore, Mechi y Pancho. Por todas las charlas, y las cervezas acompañadas de charlas. Por el intercambio de ideas y consejos en pos de ayudarnos mutuamente. Por los lindos momentos compartidos dentro y fuera del labo.

A Lau, Ceci y Tincho. Gracias por sus consejos, por las charlas en el pasillo del labo, después de un seminario, en los viajes en colectivo, en los almuerzos, en los congresos! Cada charla con ustedes no solo fue rica en contenido sino también en calidad humana. Los admiro mucho. Gracias.

A Rami, por estar tan atento y dispuesto a dar una mano. Por tu motivación contagiosa.

A Euge, Fer, Dani, Ale, Angel, Viole, Yanil, Carbó, Amaicha, Bea, Juli M., Vero, Luis, Sil, Juli S., Luz, Lu, por todos los momentos que compartimos juntos. Por todas las veces que me ayudaron y aconsejaron!

A Cynthia, por haberme ayudado todas las veces que te escribí, siempre con la mejor energía y generosidad. Gracias!

A Ale Schinder y Emilio Kropff, por haberme dado el tiempo y espacio para compartir ideas y encaminar mis próximos pasos.

A todos los que me acompañaron al laboratorio los fines de semana! Mamá, papá, Lili, Joy, Nari y Javi!

A Pat y a Ro, me formé profesionalmente junto a ustedes. Gracias por estar en todos los momentos dentro y fuera de la facu. Las adoro!

A las chicas de hip-hop, Nari, Barbi, Mica, Marian. Por escucharme, apoyarme y alentarme en esta carrera que por momentos se vuelve bastante absorbente.

A Nari, sí, una vez más, por haberme aceptado y haber buscado siempre el mejor modo de acompañarme y así sumar infinidad de momentos juntas.

A Tania, por tu apoyo y todos los momentos inolvidables. Por todas las experiencias geniales que nos quedan por compartir.

A la UBA y a CONICET. Mi formación, y en consecuencia mi vida, se debe, primero a mis viejos, y luego a la UBA, es decir a todos. Que la universidad sea pública y “gratuita” es un beneficio inmesurable. A nivel individual, te da la libertad de elegir que quieres ser. Esta posibilidad no tiene que perderse. Cuando terminé el secundario, ser química no era la opción. Esa opción la construí en el andar de los primeros pasos universitarios. Por lo que la UBA, no solo me abrió los ojos a esta posibilidad, sino que además me permitió tomarla. No pierdo de vista que la UBA no es gratuita, sino que viene de un aporte que hacemos todos, por eso mi título lo juré a la patria, y mi objetivo es que mi camino profesional retribuya todo lo que recibí. Gracias al CONICET por permitirme llevar a cabo esta Tesis y completar mi formación.

Para Baba

PUBLICACIONES

Algunos de los resultados mostrados en esta Tesis han dado lugar a las siguientes publicaciones/manuscritos:

CaMKII δ sustained expression and nucleosome occupancy dynamics are induced during the formation and maintenance of persistent forms of memory.

Zalcman G*, Federman N*[#], Fiszbein A., de la Fuente V., Ameneiro L., Romano A[#]. *Manuscrito en preparación.*

*Ambos autores contribuyeron por igual.

Nuclear factor kappa B-dependent Zif268 expression in hippocampus is required for recognition memory in mice.

Zalcman G., Federman N., de la Fuente V., Romano A[#]. *Neurobiology of Learning and Memory*. 2015 Mar. doi: 10.1016/j.nlm.2014.12.013.

[#]Autores con correspondencia.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	4
------------------------	----------

PUBLICACIONES	8
----------------------	----------

INDICE	9
---------------	----------

ABREVIATURAS Y NOTACIÓN	13
--------------------------------	-----------

I. INTRODUCCIÓN	16
------------------------	-----------

I.1 APRENDIZAJE Y MEMORIA	16
I.2 NEUROBIOLOGÍA DE LA MEMORIA	16
I.3 RETENCIÓN DE LA MEMORIA EN EL TIEMPO	17
I.4 NEUROBIOLOGÍA DE LA MCT	18
I.5 NEUROBIOLOGÍA DE LA MLT	19
I.5.1 FASES DE LA MEMORIA.....	19
I.6 CONSOLIDACIÓN DE LA MLT	21
I.6.1 MECANISMOS MOLECULARES.....	21
I.7 ROL DE NF-κB DURANTE LA CONSOLIDACIÓN DE LA MLT	23
I.7.1 NF- κ B, LA FAMILIA.....	24
I.7.2 MECANISMO DE ACTIVACIÓN.....	24
I.7.3 NF- κ B Y MEMORIA.....	25
I.7.4 GENES BLANCO DE NF- κ B.....	25
I.8 FORMACIÓN Y MANTENIMIENTO DE MEMORIAS PERSISTENTES	26
I.8.1 MECANISMOS MOLECULARES.....	27
I.9 CONSOLIDACIÓN SISTÉMICA	29
I.9.1 MECANISMOS MOLECULARES.....	30
I.10 CONTROL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	31
I.10.1 ESTRUCTURA GÉNICA Y EMPAQUETAMIENTO DEL ADN.....	32
I.10.2 CONTROL DE LA TRANSCRIPCIÓN: SECUENCIA DE ADN.....	33
I.10.3 CONTROL DE LA TRANSCRIPCIÓN: EPIGENÉTICA.....	33
I.10.4 CONTROL DE LA TRANSCRIPCIÓN: EMPAQUETAMIENTO DEL ADN.....	34
I.11 MPT DE HISTONAS Y POSICIONAMIENTO NUCLEOSOMAL	35
I.11.1 MPTS DE HISTONAS.....	35
I.11.2 REMODELAMIENTO NUCLEOSOMAL.....	37
I.11 MECANISMOS EPIGENÉTICOS EN LA MLT	39
I.12 MEMORIA DE RECONOCIMIENTO DE OBJETOS	41

I.12.1 FAMILIARIDAD, RECOLECCIÓN Y TEMPORALIDAD.....	41
I.12.2 EL PARADIGMA DE RECONOCIMIENTO DE OBJETO NOVEDOSO.....	42
I.13 ESTRUCTURAS INVOLUCRADAS EN LA MRO EN ROEDORES.....	44
I.13.1 SUSTRATOS NEUROANATÓMICOS EN ROEDORES.....	44
I.14 MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN LA CONSOLIDACIÓN DE LA MRO.....	51
I.15 BDNF.....	52
I. 15.1 EXPRESIÓN DE BDNF EN EL HIPOCAMPO Y ROL EN MEMORIA.....	53
I.15.2. MEMORIA DE RECONOCIMIENTO.....	54
I.15.3 REGULACIÓN MEDIADA POR NF-κB.....	54
I.16 ZIF268.....	55
I.15.1 EXPRESIÓN DE ZIF268 EN EL SNC Y GENES TARGET.....	55
I.15.1 EXPRESIÓN Y ROL EN MEMORIA.....	56
I.17 CAMKIIδ.....	57
I.17.1 CAMKII.....	57

II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS 62

III. METODOLOGÍA 64

III.1 SUJETOS EXPERIMENTALES.....	64
III.2 PROTOCOLO NOR.....	65
III.2A DISPOSITIVO DE ENTRENAMIENTO Y EVALUACIÓN.....	65
III.2B PROTOCOLO COMPORTAMENTAL.....	66
III.2C ANÁLISIS DE DATOS.....	69
III.3 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.....	70
III.4 CUANTIFICACIÓN PROTEICA DE ZIF268 Y BDNF.....	71
III.4A SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS EN FUNCIÓN DE SU PESO MOLECULAR:.....	71
III.4B WESTERN BLOTS.....	71
III.5 EMSA-BLOT.....	73
III.6 EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE ARNm.....	73
III.6.A EXTRACCIÓN DE ARN.....	74
III.6.B DE ARNm A CADN: REACCIÓN DE RETROTRANSCRIPCIÓN.....	74
III.6.C ANÁLISIS POR PCR EN TIEMPO REAL.....	74
III.7 CIRUGÍA E INFUSIÓN DE DROGAS.....	75
III.8 DROGAS.....	77
III.8.A NF-κB DECOY: INHIBIDOR DE LA ACTIVIDAD DE NF-κB.....	77
III.8.B OLIGODEOXINUCLEÓTIDOS MODIFICADOS COMPLEMENTARIOS A ARNm. INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA.....	77
III.9 ANÁLISIS DE POSICIONAMIENTO NUCLEOSOMAL EN LOS SITIOS κB Y SIT DEL GEN DE CAMKIIδ.....	79
III.9A ENSAYO DE NUCLEASA MICROCOCCAL.....	80
III.9.B. OCUPACIÓN NUCLEOSOMAL EN LOS SITIOS κB Y SIT: ANÁLISIS POR PCR EN TIEMPO REAL.....	80
III.10 INMUNOFLUORESCENCIA.....	81
III.10A. INCUBACIONES.....	82
> ZIF268.....	82

> ESTUDIO DE LOCALIZACIÓN DE CAMKII Δ EN DENDRITAS.	83
> ESTUDIO DE LOCALIZACIÓN DE CAMKII Δ EN SINAPSIS.....	83
> ESTUDIO DE LOCALIZACIÓN DE CAMKII Δ EN EL NÚCLEO.....	84
III.10B. VISUALIZACIÓN AL MICROSCOPIO CONFOCAL.	84
III.10C. ANÁLISIS DE IMÁGENES.	85
> ESTUDIO DE LOCALIZACIÓN EN DENDRITAS.	85
> ESTUDIO DE LOCALIZACIÓN EN SINAPSIS.	86
> ESTUDIO DE LOCALIZACIÓN EN NÚCLEO.....	87
III.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	87

IV. RESULTADOS 89

IV.I.1 UN ENTRENAMIENTO FUERTE INDUCE LA CONSOLIDACIÓN DE LA MRO EN RATONES DE LA CEPA CF1	90
IV.I.2 NF-κB SE ACTIVA EN EL HIPOCAMPO DURANTE LA CONSOLIDACIÓN DE LA MRO	91
IV.I.3 LA ACTIVACIÓN DE NF-κB EN EL HIPOCAMPO ES NECESARIA PARA LA CONSOLIDACIÓN DE LA MRO ...	93
IV.I.4 EXPRESIÓN PROTEICA DE BDNF Y ZIF268 EN EL HIPOCAMPO DURANTE LA CONSOLIDACIÓN DE LA MRO	95
BDNF.....	96
ZIF268	99
IV.I.5 LA EXPRESIÓN DE ZIF268 EN EL HIPOCAMPO ES NECESARIA PARA LA CONSOLIDACIÓN DE LA MRO ..	103
IV.6 LA EXPRESIÓN DE ZIF268 DURANTE LA CONSOLIDACIÓN DE LA MRO ES DEPENDIENTE DE LA ACTIVACIÓN DE NF-κB.	108
IV.II.1 ROL DE CAMKIIδ DURANTE LA CONSOLIDACIÓN DE LA MRO.	110
IV.II.1A DISMINUCIÓN DE LOS NIVELES DE ARNm DE CAMKII Δ LUEGO DE LA INFUSIÓN INTRA-HIPOCAMPAL DE OLIGONUCLEÓTIDOS COMPLEMENTARIOS.....	110
IV.II.1B EFECTO COMPORTAMENTAL DE LA INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE CAMKII Δ DURANTE LA CONSOLIDACIÓN DE LA MRO.	112
IV.II.2 EXPRESIÓN DE CAMKIIδ A DISTINTOS DÍAS LUEGO DEL ENTRENAMIENTO	114
IV.II.4. ROL DE CAMKIIδ EN EL MANTENIMIENTO DE LA MLT.	122
IV.II.5 POSICIONAMIENTO NUCLEOSOMAL EN TORNO AL SITIO κB Y AL SITIO DE INICIO DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL PROMOTOR DE CAMKIIδ.	123
IV.II.5.1 OCUPACIÓN NUCLEOSOMAL EN EL SITIO κ B.....	125
IV.II.5.2 OCUPACIÓN NUCLEOSOMAL EN EL SITIO SIT.....	128
IV.II.6 CAMKIIδ SE ENCUENTRA PRINCIPALMENTE EN DENDRITAS, PRE-SINAPSIS Y NÚCLEOS DE NEURONAS HIPOCAMPALES.	131
IV.II.6A DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE CAMKII Δ EN DENDRITAS	132
IV.II.6B.DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE CAMKII Δ EN SINAPSIS.....	134
IV.II.6C. DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE CAMKII Δ EN EL NÚCLEO.	136

V. DISCUSIÓN 139

V.1 ROL DE NF-κB EN LA CONSOLIDACION DE LA MLT	139
V.2 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE BDNF DURANTE LA CONSOLIDACIÓN DE LA MRO	140
V.2.1. EXPRESIÓN PROTEICA	140

V.2.2. REGULACIÓN POR NF-KB.....	142
V. 3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ZIF268 DURANTE LA CONSOLIDACIÓN DE LA MLT	142
V.3. 1. EXPRESIÓN PROTEICA	143
V.3.2. REGULACIÓN POR NF-KB.	144
V.4. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CAMKIIδ.....	144
V.4.1. CAMKII Δ , ¿LA ISOFORMA SUBESTIMADA?	144
V.4.2. ROL DE CAMKII Δ DURANTE LA CONSOLIDACIÓN DE LA MRO.	145
V.4.3. ROL DE CAMKII Δ EN MECANISMOS DE MANTENIMIENTO DE LA MRO.	145
V. 5. DINÁMICA DEL POSICIONAMIENTO NUCLEOSOMAL.....	146
V.5.1. IMPORTANCIA DE LOS SITIOS DE UNIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN Y EL SITIO SIT.....	147
V.5.2. OCUPACIÓN NUCLEOSOMAL. ¿A FAVOR O EN CONTRA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA?	149
V.5.3. ROL DE NF-K β EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CAMKII Δ	151
V.5.4. CAMBIOS EN LA OCUPACIÓN NUCLEOSOMAL COMO UN MECANISMO EXCLUSIVO DE GENES VINCULADOS A MLTS PERSISTENTES.....	151
V.6. LOCALIZACIÓN SUB-CELULAR DE CAMKIIδ Y POSIBLES FUNCIONES.....	152
V.6.1. DENDRITAS.....	152
V.6.2. PRE-SINAPSIS	152
V.6.3. NÚCLEO	153
V.7. FORMACIÓN Y MANTENIMIENTO DE MEMORIAS PERSISTENTES: RETOMANDO LA HIPÓTESIS DE CRICK. 154	
V.7. DEL ROL DEL HIPOCAMPO EN EL PARADIGMA NOR	156
<u>VI. CONCLUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS A FUTURO</u>	<u>158</u>
<u>VI. BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>159</u>
<u>VII. APENDICE</u>	<u>185</u>

ABREVIATURAS Y NOTACIÓN

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro, del inglés *brain derived neurotrophic factor*

CaMKII: Proteína quinasa tipo II, dependiente de calcio y calmodulina, del inglés *Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II*

CREB: Proteína de unión al elemento que responde a AMP cíclico, del inglés *cAMP response element binding protein*

CEBP: Proteína de unión al elemento CCAAT β , del inglés *CCAAT/enhancer-binding protein beta*

DOR: Densidad óptica relativa

EMSA: Ensayo del corrimiento en la movilidad electroforética, del inglés *electrophoretic mobility shift assay*

HAB: sesión de habituación

HAT: Enzima acetil-transferasa de histonas, del inglés *histone acetyl transferase*.

HDAC: Enzima desacetilasa de histonas, del inglés *histone desacetylase*

Hdl: sesión de handling

FT: Factor de transcripción

fTR: Entrenamiento fuerte

ID: Índice de discriminación

IKK: Quinasa de I κ B, del inglés *I κ B Kinase*

I κ B: Proteína inhibitoria κ B

LTD: Depresión de largo término, del inglés *long-term depression*

LTP: Potenciación de largo término, del inglés long-term potentiation

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos, del inglés *mitogen-activated protein kinase*

MCT: Memoria de corto término

MLT: Memoria de largo término

MR: Memoria Remota

mDecoy: κ B-Decoy con una base mutada (ver Materiales y métodos)

MMP: Metaloproteasas de la matriz extracelular, del inglés matrix metalloproteinases

NF- κ B: Factor nuclear kappaB, del inglés nuclear factor kappaB

NLS: Señal de localización nuclear, del inglés nuclear localization signal

No-TR: No entrenado

NOR: Paradigma de reconocimiento de objeto novedoso, del inglés *novel object recognition*.

OA: oligonucleótido aleatorio

OC: oligonucleótido complementario

PKM: Proteína quinasa M ζ

pMLT: memoria de largo término persistente

RHD: Dominios homólogos a Rel, del inglés Rel homology domains

TNF: Factor necrótico de tumores, del inglés tumor necrosis factor

TR: Entrenamiento estándar

TS: sesión de evaluación o testeo.

Veh: Vehículo

Zif268: Proteína dedos de zinc-268, del inglés *zinc-finger 268*

NOTACIÓN

- En algunos casos, cuando nos referiramos al plural de estas abreviaturas se le agregará una s al final de la abreviatura, por ejemplo factores de transcripción lo escribiremos FTs.
- Los genes figuran en minúscula y cursiva. Las proteínas pueden figurar con la primer letra en mayúscula o todas en mayúscula si se trata de una abreviatura.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 APRENDIZAJE Y MEMORIA

Existen diversas formas de definir los procesos de aprendizaje y memoria en función del nivel de análisis que se haga de los mismos. Desde el punto de vista comportamental y neurobiológico, definiremos **Aprendizaje** como el *proceso por el cual el sistema nervioso incorpora nueva información que se manifiesta en un cambio en la respuesta comportamental del individuo* y diremos que en el cerebro esta información adquirida es *codificada espacio-temporalmente en circuitos neuronales*. **Memoria** es entonces la *retención de este cambio comportamental en el tiempo* que a nivel neurobiológico implica el *mantenimiento de los circuitos neuronales que la codifican mediante cambios en las propiedades reactivas de las neuronas* (Purves, 2003; Maldonado, 2008; Sweatt, 2009).

I.2 NEUROBIOLOGÍA DE LA MEMORIA.

PLASTICIDAD SINÁPTICA.

En el año 1970 comenzaron a publicarse evidencias claras de que el aprendizaje resulta de **cambios en la fuerza de las conexiones sinápticas entre neuronas interconectadas** (figura I.2i, revisado en (Kandel, 2001). La hipótesis de **memoria y plasticidad sináptica** emergió entonces como un modelo fundamental para el almacenaje de información en el sistema nervioso, que involucra la propia arquitectura celular, molecular y estructural de las neuronas. Ésta establece que *“la actividad neuronal durante la formación de la memoria induce plasticidad sináptica en ciertas sinapsis apropiadas, y este evento es necesario y suficiente para que el tipo de memoria en cuestión sea almacenado en la estructura cerebral en la que tienen lugar los cambios plásticos”* (Martin et al., 2000). Hoy en día, está ampliamente aceptado que durante el aprendizaje ocurren cambios reversibles en la transmisión sináptica, y que estos cambios deben ser estabilizados o consolidados para que una memoria perdure.

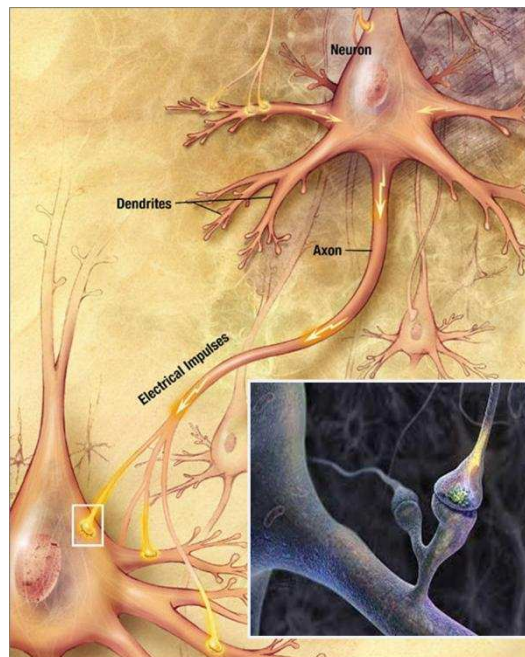


Figura 1.2i. Transmisión sináptica entre neuronas interconectadas. El dibujo muestra dos neuronas interconectadas y la dirección del flujo de la información, codificada por impulsos eléctricos que viajan desde el axón de la neurona pre-sináptica a la dendrita o soma de la neurona post-sináptica. El recuadro en el extremo inferior derecho es una vista ampliada de la sinapsis en la que se distinguen claramente la terminal pre-sináptica y la espina post-sináptica que emerge de la dendrita.

I.3 RETENCIÓN DE LA MEMORIA EN EL TIEMPO

MCT, MLT Y MR.

En función de su duración en el tiempo, las memorias pueden clasificarse en, por lo menos, tres tipos: la **memoria de corto término (MCT)** que dura de segundos a horas, la **memoria de largo término (MLT)** que puede durar un día o meses y la **memoria remota (MR)** que puede durar desde meses hasta toda la vida (McGaugh, 2000). Estos tipos de memoria se diferencian por los procesos neurobiológicos que subyacen a su formación. Brevemente, la MCT involucra vías de señalización intracelular y modificaciones post-traduccionales en proteínas ya existentes, la MLT además requiere de la transcripción de ciertos genes y de síntesis *de novo* de proteínas y la MR requiere de la reorganización y estabilización de la conectividad entre distintas estructuras cerebrales (McGaugh, 1966a, 2000; Frankland and Bontempi, 2005). El grafico de la figura 1.3i es un modelo basado en evidencia empírica que propone que una vez que se induce la formación de cada uno de los tipos de memoria, su fuerza aumenta, y en el caso de la MCT y MLT, llega a un punto crítico a partir del cual la

fuerza decae y ambos tipos de memoria pueden perderse o sufrir un proceso de olvido. La fuerza de la MR en cambio permanecería estable en el tiempo.

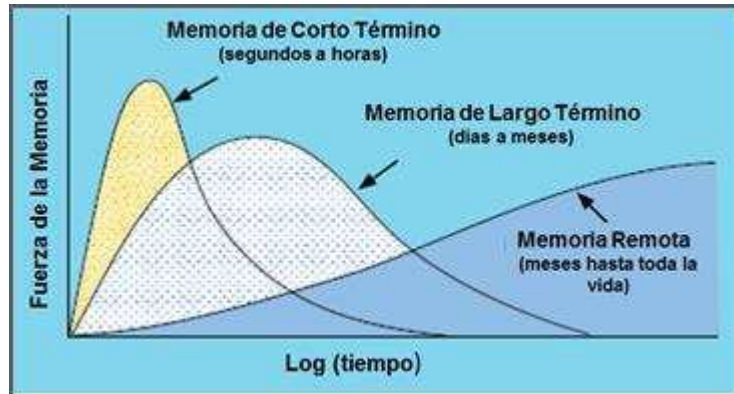


Figura 1.3i: Modelo propuesto para los tipos de memoria en función de su retención en el tiempo. El gráfico indica la fuerza de cada uno de los tipos de memoria en función del tiempo en escala logarítmica. Mientras las memorias de corto y largo término decaen con el tiempo, la memoria remota se haría más fuerte. Adaptado del artículo "Memory- a century of consolidation" (McGaugh, 2000).

Aún no existe un consenso con respecto a si la formación de estos tipos de memoria tiene lugar de manera secuencial, es decir que la formación de la MLT vendría a continuación y requeriría de la formación de la MCT y lo mismo para la MR respecto de la MLT, o si son procesos independientes y paralelos. Inicialmente Donald Hebb postuló un modelo en serie denominado *hipótesis de trazo-dual* (Hebb, 1949; Cooper, 2005). Sin embargo, diversos tipos de drogas demostraron poder bloquear la MCT sin afectar la MLT (y viceversa) lo que dió lugar a una hipótesis alternativa según la cual estos dos procesos tendrían lugar de manera independiente (McGaugh, 1966b, 2000). Algunos autores argumentan que las drogas empleadas en estos últimos experimentos podrían estar afectando la expresión comportamental de la MCT y no su formación, por lo que no sería evidencia contundente para rechazar la hipótesis de una construcción en serie (Maldonado, 2008). Esta cuestión sigue siendo una pregunta abierta en el campo de las neurociencias.

I.4 NEUROBIOLOGÍA DE LA MCT

La activación neuronal lleva a la liberación de neurotransmisores que inducen el aumento intracelular de segundos mensajeros como Ca^{2+} y AMPc. Estos activan cascadas de señalización, que a su vez activan proteínas quinasas, que generan modificaciones covalentes en proteínas preexistentes. Las modificaciones introducidas modulan la actividad de canales iónicos, la afinidad y el número de receptores alojados en la membrana post-sinápticos, y la síntesis y movilización de vesículas sinápticas a la

zona activa de liberación, entre otros (Kandel, 2001; Dudai, 2002). Estos mecanismos están destinados a afectar la eficacia sináptica, aumentando o disminuyendo la habilidad de la neurona presináptica de liberar neurotransmisores, o afectando la sensibilidad de la neurona post-sináptica a los neurotransmisores liberados. No obstante, estos cambios moleculares son transitorios y por ello la memoria de corto término decae luego de unas horas. A continuación, veremos los mecanismos moleculares que permiten la formación de memorias más duraderas.

I.5 NEUROBIOLOGÍA DE LA MLT

Los mecanismos moleculares subyacentes a la formación de una MLT deben inducir cambios estables en la transmisión sináptica de manera tal de permitir que esta memoria sea almacenada durante días o meses. A partir de estudios farmacológicos, moleculares y conductuales, se observó que estos mecanismos moleculares diferían en función del tiempo transcurrido desde la experiencia comportamental. De este modo, se definieron diferentes fases o etapas por las que transcurre el proceso de formación de una MLT a partir del momento del aprendizaje.

I.5.1 Fases de la memoria.

La memoria se constituye de tres fases o etapas básicas: la *adquisición* de nueva información durante una experiencia comportamental, la *consolidación* de esta nueva información en circuitos neuronales y la *evocación* de la información incorporada evidenciada por un cambio en la respuesta comportamental (revisado por Abel and Lattal, 2001). La evocación puede desencadenar las fases de reconsolidación o extinción, que no profundizaremos en esta Tesis.

La figura I.5i muestra estas tres fases en relación a los eventos neurobiológicos y comportamentales subyacentes (Abel and Lattal, 2001; Josselyn et al., 2015):

Adquisición. La experiencia comportamental durante la cual se produce la adquisición de nueva información suele referirse como *entrenamiento*. Durante este entrenamiento, el animal procesa información relativa a la experiencia por medio de registros sensoriales periféricos que proyectan luego a estructuras del sistema nervioso central, dando lugar así a la activación de neuronas relevantes al proceso. En el ejemplo de la figura, el animal es colocado dentro de una caja, y al cabo de un rato suena un tono que co-termina con un shock eléctrico. El animal procesa la información contextual (caja) y de clave (tono) como estímulos condicionados, y el estímulo incondicionado (shock), y se produce una asociación entre ambos.

Consolidación. Luego del entrenamiento, el animal es devuelto a su caja de alojamiento determinando el cese del estímulo condicionado. Mientras tanto, la memoria de la asociación recientemente aprendida es gradualmente transformada desde un estado lábil a uno estable, formando una MLT, en nuestro ejemplo de miedo a la caja o al tono, que puede durar desde por lo menos un día (24hs) hasta meses. En la próxima sección se ahondará en los procesos moleculares que tienen lugar durante esta etapa, pero aquí queremos mencionar que esta fase se descubrió luego de la observación de que las intervenciones farmacológicas (entre otras) dentro de aproximadamente las primeras 6hs post-entrenamiento disrumpen la retención de la MLT evaluada, generalmente, 24hs luego del entrenamiento.

Como resultado de la consolidación se estabiliza la *traza mnésica*. Dicho de otro modo, la representación neuronal de la información adquirida permanece estable durante un tiempo.

En los últimos años, han surgido evidencias de mecanismos moleculares que participan de eventos que afectan la persistencia de la MLT en el tiempo. En algunos casos, estos mecanismos moleculares tienen lugar durante la consolidación de la MLT (Federman et al., 2013). En otros, estos mecanismos tienen lugar en períodos acotados a continuación de la consolidación, cuando la MLT ya fue formada (Bekinschtein et al., 2010). A su vez, se postula la presencia de mecanismos moleculares que actúan activamente sobre la traza en cuestión y participarían en el mantenimiento de la memoria (Fioriti et al., 2015; Cammarota et al., 1996; Sacktor et al., 1993). Estas observaciones son más recientes que el concepto de consolidación y aún no hay un consenso sobre una fase de la memoria que las englobe fehacientemente. Los mecanismos moleculares subyacentes serán discutidos en mayor detalle en la sección I.8.

Evocación. El término se refiere a aquellos procesos que permiten activar la traza mnésica que codifica para la memoria adquirida y consolidada. Desde el punto de vista experimental, la evocación de la memoria requiere exponer al animal a un recordatorio que permite evidenciar la presencia de la memoria original mediante un cambio en su respuesta comportamental. En el ejemplo de la figura 1.5i, el animal es reintroducido a la caja de entrenamiento, se le presenta el tono, y se observa que el animal hace una respuesta de *freezing*, que es una respuesta de miedo condicionada y que indica que el animal recuerda lo aprendido durante la adquisición. Desde el punto de vista neurobiológico hay varias teorías vigentes respecto a los mecanismos subyacentes, pero la idea general es que la experiencia comportamental induciría la activación de la traza mnésica.

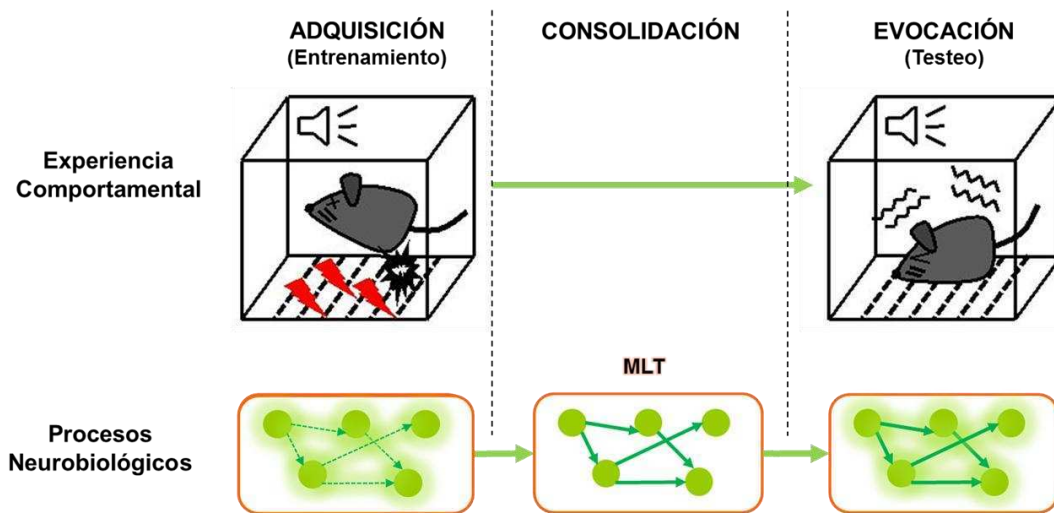


Figura 1.5i: Fases de la MLT. El dibujo muestra la experiencia comportamental y los procesos neurobiológicos asociados a cada una de las fases de la MLT, tomando como ejemplo el caso que se observa en la tarea de condicionamiento de miedo.

A continuación, analizaremos los mecanismos moleculares subyacentes a la etapa de consolidación y mantenimiento de memorias de largo término persistentes (pMLT), ya que son los procesos sobre los cuales trabajaremos a lo largo de la Tesis.

I.6 CONSOLIDACIÓN DE LA MLT.

I.6.1 Mecanismos Moleculares.

Tal como se mencionó en la sección 1.5, la fase de consolidación se descubrió al observar que diversos agentes amnésicos administrados durante las primeras horas luego del entrenamiento interferían con la retención de la MLT. Los mecanismos moleculares que subyacen a esta fase se fueron descubriendo justamente en relación a los agentes amnésicos empleados. De este modo, los primeros dos grandes descubrimientos a nivel molecular y que delinearon el sello distintivo de esta fase y de la MLT a la que da lugar, es que la MLT era afectada negativamente por agentes que inhiben la **síntesis de proteínas** y agentes que inhiben la **síntesis de ARNm** (ARN mensajero proveniente de la transcripción génica) (McGaugh, 1972; Davis and Squire, 1984). Esto indica que, durante esta etapa hay **transcripción génica** y **traducción a proteína** y así se establece una diferencia clara con la formación de la MCT en la que estos procesos no tienen lugar. Los cambios en el patrón de expresión génica son necesarios para producir alteraciones fisiológicas y morfológicas de largo término en las terminales sinápticas así como en procesos de sinaptogénesis (formación de nuevas conexiones sinápticas) (Montarolo et al., 1986; Castellucci et al., 1989; Glanzman et al., 1990). Se postula que tales procesos de plasticidad neuronal llevan a la reorganización

de los contactos sinápticos de las neuronas involucradas y constituyen los mecanismos celulares básicos que dan sustento a la formación de la MLT.

Actualmente, se encuentra bien establecido que la consolidación tiene lugar durante aproximadamente las primeras 6 hs luego del entrenamiento, y que dentro de este período suelen haber dos “olas” de expresión génica: una tiene lugar inmediatamente después del entrenamiento y decae pasadas 1-2hs, y la otra se observa entre las 3-6hs (Freeman et al., 1995; Bourtchouladze et al., 1998; Quevedo et al., 1999; Freudenthal and Romano, 2000; Igaz et al., 2002). Durante el primer período se expresarían genes de respuesta temprana esenciales para la formación de la MLT, algunos de los cuales codificarían para factores de transcripción, y durante el segundo periodo se transcribirían y traducirían genes y proteínas efectoras que serían traslocadas a las terminales sinápticas para dar lugar a la remodelación necesaria (Freeman et al., 1995; Quevedo et al., 1999).

Genes de Respuesta Temprana y Tardía

Los genes de respuesta temprana (IEG, por sus siglas en inglés, *immediate-early genes*) son denominados de este modo debido a que su expresión no requiere de síntesis proteica sino de la activación de FTs constitutivos pre-existentes, y esto les permite inducir su expresión rápidamente. En promedio, el pico máximo de expresión génica se observa 30 minutos luego de la activación por señales extra-celulares. La expresión de los genes de respuesta tardía, en cambio, requiere de la expresión génica o proteica de algunos de estos IEGs y es por ello que su inducción ocurre a tiempos posteriores. (Tullai et al., 2007).

Factores de transcripción involucrados en la consolidación de MLT.

Los FTs constitutivos críticamente involucrados en el primer período de expresión génica son: la proteína de unión al elemento que responde a AMP cíclico (**CREB**, del inglés, *cAMP response element binding protein*) y el factor nuclear KappaB (**NF-κB**, del inglés *nuclear factor KappaB*). Dos de los genes de respuesta temprana que son transcriptos en este periodo y que dan lugar a FTs que también se encuentran ampliamente involucrados en distintas tareas de aprendizaje y memoria son: la proteína de unión al elemento CCAAT(**C/EBP**, del inglés *CCAAT enhancer binding protein*) y el factor de respuesta a crecimiento temprano (Egr-1, del inglés *early growth response factor*, también conocido como **Zif268**) (Alberini y Kandel, 2015).

La figura I.6i resume los eventos moleculares que tienen lugar durante esta fase.

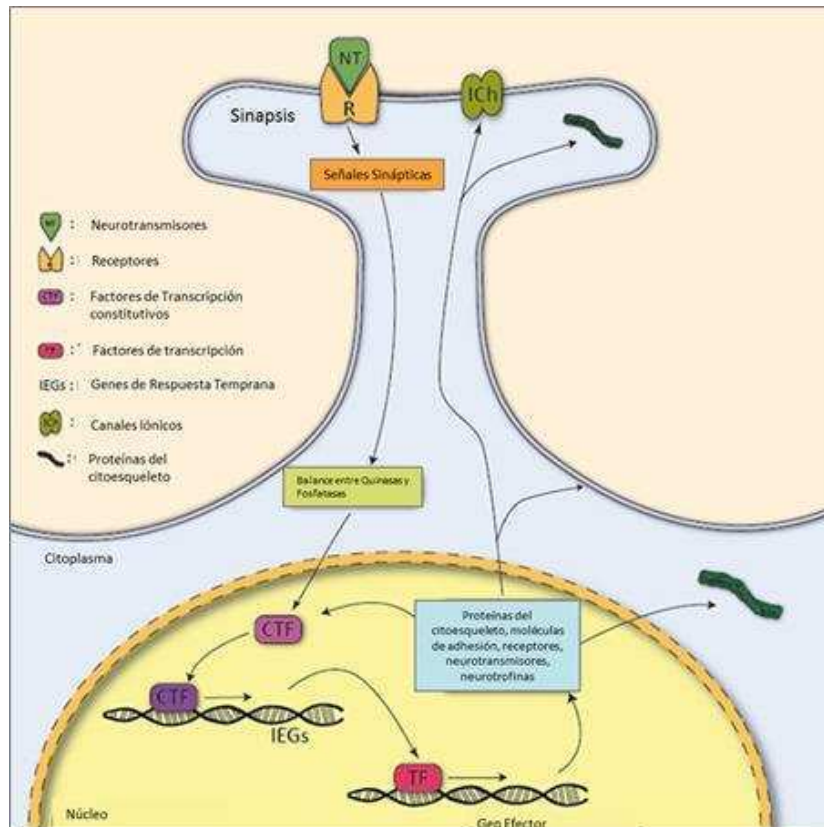


Figura I.6i: Señalización molecular durante la consolidación de la MLT. El dibujo resume los eventos moleculares que tienen lugar durante la consolidación de la MLT. La actividad sináptica induce un aumento intracelular de segundos mensajeros que modifican el balance de la actividad entre quinasas y fosfatasa, en general a favor de las primeras. Si la actividad sináptica es lo suficientemente fuerte, la señalización llega al núcleo por medio de FTs constitutivos o la translocación de quinasas. Los FTs son rápidamente activados mediante modificaciones post-traduccionales, generalmente fosforilaciones. Estos inducen la expresión de genes de respuesta temprana que codifican para otros FTs o proteínas efectoras. Adaptado de Romano, 2012.

I.7 ROL DE NF- κ B DURANTE LA CONSOLIDACIÓN DE LA MLT

A lo largo de la última década, numerosos trabajos han demostrado que NF- κ B es un FT clave para la formación y re-procesamiento de memorias de largo termino (de la Fuente et al., 2015), de manera tal que, hoy en día su rol en estos procesos está bien establecido. Muchos de estos trabajos fueron realizados en este laboratorio. El próximo paso, y al que intenta aportar esta Tesis, es estudiar genes que estarían siendo regulados por este FT durante estos procesos. A continuación, describiremos algunas características básicas de este FT, su mecanismo de activación y algunos genes blanco conocidos.

I.7.1 NF-κB, la familia.

NF-κB comprende una familia de proteínas altamente conservadas evolutivamente, constituida en vertebrados por cinco miembros: Rel B, c-Rel, p65 (Rel A), p50 y p52; los últimos dos son productos del clivaje proteolítico de precursores más grandes. Todos los miembros pueden formar tanto homodímeros como heterodímeros, salvo Rel B que sólo puede formar heterodímeros. El dímero más abundante en mamíferos es p50-p65, y por ello es uno de los más estudiados (Kaltschmidt et al., 2005; Meffert and Baltimore, 2005). Las proteínas Rel/NF-κB están relacionadas entre sí por presentar dominios amino-terminales RHD (del inglés, *Rel homology domain*) que contienen varios elementos estructurales, como el **sitio de unión al ADN, de localización nuclear, de dimerización altamente conservado, y la región de interacción con la proteína inhibitoria κB** (IκB, del inglés *inhibitory protein κB*, Kaltschmidt et al., 2005)).

I.7.2 Mecanismo de activación.

A continuación describiremos la forma de activación canónica de NF-κB. Cuando no existe estimulación por parte de alguna de las vías de activación, los dímeros NF-κB se encuentran inactivos en el citoplasma debido a su unión con la proteína reguladora IκB. Dicha proteína no sólo enmascara la señal NLS, cambiándole su conformación espacial y así impidiendo que sea reconocida por las importinas correspondientes, sino que también posee una señal de exportación nuclear muy fuerte. Ante una estimulación, se activa el complejo quinasa de IκB (IKK) que, como lo indica su nombre, fosforila IκB induciendo a su ubiquitinización y posterior degradación. La “liberación” de NF-κB de su inhibidor expone su señal NLS y en consecuencia permite su translocación al núcleo donde tendrán lugar los procesos de transcripción (figura 1.7i, Kaltschmidt et al., 2005; Mattson and Meffert, 2006).

Una gran variedad de estímulos activan NF-κB en el sistema nervioso, entre ellos se destacan: el factor de crecimiento nervioso (NGF, del inglés *nerve growth factor*) y varias de las vías de transducción de señales asociadas a receptores de neurotransmisores como el glutamato (receptores de tipo NMDA, AMPA y Kainato) y la entrada de Ca²⁺. Su capacidad de ser activado tanto por transmisión sináptica como por actividad eléctrica es importante pues con ella se explica la actividad constitutiva de NF-κB observada en el sistema nervioso y su activación dependiente de actividad neuronal. Existen otras formas en las que la actividad de NF-κB está regulada. Por mencionar algunos ejemplos, la subunidad p65 puede aumentar su actividad de transactivación por fosforilación (Zhong et al., 1997, 1998, 2002; Dong et al., 2008) o por acetilación (regulando su permanencia en núcleo y aumentando la afinidad por el ADN). A su vez, puede sufrir degradación vía proteasomas nucleares o inactivación por desacetilación (Chen et al., 2001, 2002).

I.7.3 NF-κB y memoria.

Si bien la expresión de NF-κB ha sido originalmente estudiada en procesos de inflamación y de respuesta en la defensa ante algún patógeno, también ha sido demostrada su expresión en el sistema nervioso central y periférico, tanto en neuronas como en glia, siendo el heterodímero **p65/p50** y el **homodímero de p50** los más comunes en neuronas (O'Neill and Kaltschmidt, 1997; Meffert and Baltimore, 2005). NF-κB se encuentra expresado ubicuamente en el sistema nervioso (O'Neill and Kaltschmidt, 1997; Bhakar et al., 2002), mostrando una gran actividad constitutiva en algunos tipos neuronales. Particularmente en ratón, presenta actividad en neuronas piramidales y granulares del hipocampo. Uno de los descubrimientos más intrigantes respecto a este FT en el sistema nervioso central, fue su presencia en las sinapsis. Esto lo sugirió como un mediador clave entre los procesos que ocurren localmente en ésta y la expresión génica que tiene que tener lugar en el núcleo para introducir cambios neurobiológicos sostenidos en el tiempo (Kaltschmidt et al., 1993; Guerrini et al., 1995). En el sistema nervioso central, los FTs de la familia Rel/NF-κB están involucrados en respuestas celulares a agresiones como isquemia y trauma; regulación de la apoptosis; desarrollo y crecimiento; desórdenes neurodegenerativos; plasticidad sináptica y memoria (Kaltschmidt et al., 1993; Meberg et al., 1996; Suzuki et al., 1997; Freudenthal and Romano, 2000; Meffert et al., 2003). Los trabajos realizados en nuestro laboratorio empleando el cangrejo *Neohelice granulata*, han sido pioneros en el estudio del rol de NF-κB en memoria (Romano et al., 2006). En vertebrados, participa de la expresión génica que tiene lugar durante la consolidación (Yeh et al., 2002; Meffert et al., 2003; Freudenthal et al., 2005; Ahn et al., 2008), reconsolidación (Boccia et al., 2007; Lubin and Sweatt, 2007) y extinción de la memoria (Merlo and Romano, 2008; de la Fuente et al., 2011).

I.7.4 Genes blanco de NF-κB

Existe una gran variedad de genes blanco activables por NF-κB, aunque pocos de estos han sido directamente vinculados con este FT durante procesos mnésicos. A continuación destacaremos aquellos que se encuentran río abajo de este FT y codifican para proteínas involucradas en procesos de memoria: factores neurotróficos y de crecimiento, tales como BDNF (Lubin et al., 2008; Mattson and Meffert, 2006) y NGF (Heese et al., 2006); FTs tal como ZIF268/EGR-1 (Carayol et al., 2006; Lubin and Sweatt, 2007), quinasas como PKA (subunidad catalítica; Kaltschmidt et al., 2006) y CaMKIIδ (Federman et al., 2013; Neidl et al., 2016), metaloproteasas de la matriz extracelular como MMP3 (del inglés, *matriz metalloproteinase 3*; Borghaei et al., 2004) y MMP9 (del inglés, *matriz metalloproteinase 9*; Bond et al., 1998) y moléculas de adhesión celular como la molécula de adhesión celular neural (NCAM, del inglés *neural cell adhesion molecule*; Simpson and Morris, 2000), entre otros.

La figura 1.7i resume la cascada de señalización molecular de la que participa NF- κ B en el sistema nervioso central (SNC).

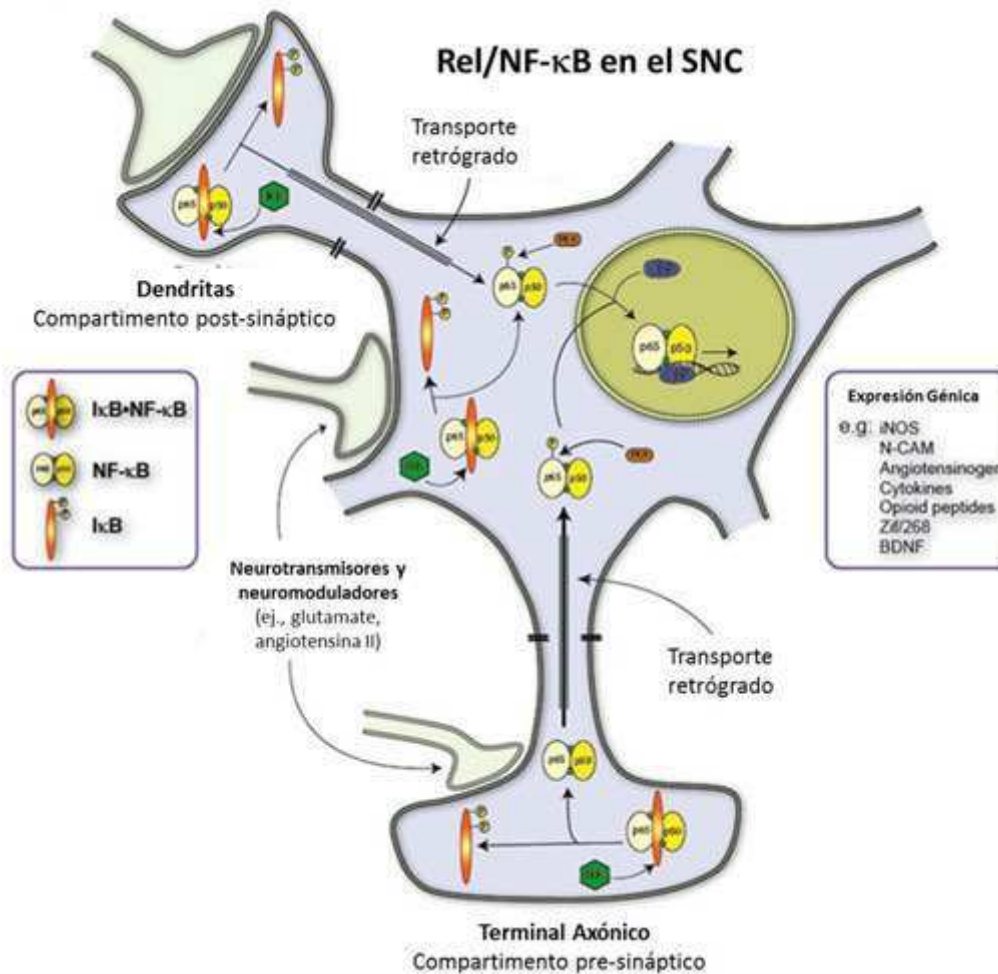


Figura 1.7i: Señalización molecular asociada a NF- κ B en el SNC. El dibujo resume la vía de activación y señalización de NF- κ B durante la consolidación de la MLT (Romano, 2012).

I.8 FORMACIÓN Y MANTENIMIENTO DE MEMORIAS PERSISTENTES.

Hay memorias de largo término que duran días o semanas ¿Cuáles son los eventos moleculares que afectan la duración de la MLT en el tiempo? ¿Cuándo tienen lugar?

En 1984, Francis Crick observó que el tiempo de vida media de una MLT es mucho mayor que los tiempos de vida medios de los ARNm y las proteínas que la componen. En consecuencia, propuso que para que la MLT se forme y perdure se *necesitan cambios sinápticos y algún mecanismo sostenido autónomamente en el tiempo que*

continúe operando aún luego de la introducción de los cambios sinápticos, de manera tal de mantenerlos. De este modo, hipotetizó que **la actividad enzimática** local estaría reemplazando activamente las **proteínas sinápticas** de manera tal de conservar el estado activo de la sinapsis en cuestión (Crick, 1984; Kwapis and Helmstetter, 2014; Rudy, 2015).

A continuación, describiremos las evidencias más relevantes aportadas por varios trabajos destinados a estudiar los procesos moleculares que se inducen como consecuencia de la experiencia comportamental y que afectan **la duración de la MLT en el tiempo**. Las evidencias presentadas se centrarán principalmente en estudios realizados en el hipocampo por su relevancia en tareas de aprendizaje y memoria y por ser la estructura sobre la cual se trabajará en esta Tesis. Cabe aclarar, que actualmente no hay una hipótesis consensuada respecto a cómo se engranan cada uno de estos procesos, ni se ha propuesto una fase de la memoria que los contemple fehacientemente. En consecuencia, para describirlos, en la presente Tesis decidimos hacerlo considerando el orden cronológico en el que tienen lugar a partir de la fase de consolidación de la MLT.

I.8.1 Mecanismos moleculares.

Durante los últimos años, se publicaron varias evidencias mostrando que unas horas luego de finalizada la consolidación de la MLT aún se observan cambios de expresión génica y proteica que persisten hasta 24hs luego de la experiencia comportamental. En particular, se observó que el entrenamiento a un paradigma aversivo induce cambios en los niveles proteicos de los factores de transcripción c-fos y ZIF268 (Katche et al., 2012a, 2010), en las quinasas CaMKII α , ERK y Akt (todas involucradas en fenómenos de plasticidad y memoria) y en la proteína post sináptica Homer 1a (que interactúa con diversas proteínas en la densidad post-sináptica y juega un rol importante en la vía de señalización glutamatérgica - Xiao et al., 2000) (Igaz et al., 2004), entre otros. También se observó que la síntesis proteica de BDNF aumenta 12hs luego de un entrenamiento aversivo y lleva a cambios en la fosforilación de ERK (Bekinschtein et al., 2008). Estos cambios de expresión presentan tres particularidades, i) tienen lugar a continuación de la consolidación de la memoria pero dentro de las 24hs de la experiencia comportamental, ii) en todos los casos se demostró que la expresión se da en forma de “olas”, es decir que se observa un aumento seguido de una caída en la expresión y iii) la inhibición de la síntesis proteica, de ARNm y de algunas de las proteínas mencionadas anteriormente, en este período, afecta la persistencia de la MLT en el tiempo, pero no su formación. Estos trabajos pertenecen al mismo grupo de trabajo y, a raíz de sus resultados y los de otros que observaron cambios similares, propusieron que estos cambios moleculares formarían parte de una **consolidación tardía** que

estaría formada por olas de expresión génica recurrentes, destinadas al mantenimiento de la traza mnésica (revisado en Bekinschtein et al., 2010).

Por otro lado, en otro trabajo se demostró que luego de un entrenamiento aversivo se produce un aumento de los receptores AMPA en el hipocampo, y que este se observa hasta dentro de las primeras 48hs de la experiencia comportamental, pero retorna a los niveles basales a los 7 días (Cammara et al., 1996). Luego, Riedel y colaboradores demostraron que la inyección intrahipocampal de un antagonista de los receptores AMPA tenía efecto amnésico si se lo daba en forma crónica entre 1 y 7 o 5 y 12 días luego de un entrenamiento pero no frente a una única infusión a las 24hs del entrenamiento (Riedel et al., 1999). Actualmente se propone, que los cambios en el número de receptores AMPA en la membrana post-sináptica, al igual que los cambios que afectan su conductancia y sensibilidad al glutamato y que tienen lugar durante la consolidación de la MLT, deben ser sostenidos en el tiempo para permitir mantener los cambios en la eficacia sináptica, ya que esto permitiría que la MLT perdure en el tiempo (Ghosh et al., 2015; Rudy, 2015).

Otro proceso que fue propuesto para el mantenimiento de la memoria es la actividad sostenida de la proteína quinasa PKM ζ . En 1993, se presentó la primera evidencia de que la expresión de PKM ζ participa en el mantenimiento de LTP, un mecanismo de plasticidad sináptica que lleva a la potenciación de la respuesta electrofisiológica de la sinapsis y que se especula es una de las bases neurofisiológicas de la memoria (Bliss and Collingridge, 1993; Sacktor et al., 1993). Años más tarde Ling y colaboradores encontraron que la inhibición de PKM ζ con el inhibidor ZIP interfiere con el mantenimiento del LTP pero no su inducción (Ling et al., 2002). A partir de allí, se publicaron numerosos trabajos en los que se inhibió PKM ζ usando el péptido ZIP, en el hipocampo y otras estructuras, varios días luego de un aprendizaje. En todos los casos esta manipulación resultó amnésica, aún cuando la infusión se realizaba incluso 30 días luego del entrenamiento (revisado en Sacktor, 2008). Estos sorprendentes resultados junto con otros mostrando que la proteína regula el número de receptores AMPA en la post-sinapsis, llevaron a postular que PKM ζ sería una enzima como la propuesta por Crick, cuya actividad y expresión se sostienen autónomamente en el tiempo, de manera tal de mantener los cambios sinápticos inducidos durante la consolidación (revisado en Kwapis and Helmstetter, 2014). Pero esta hipótesis fue cuestionada en 2013 cuando dos trabajos con animales transgénicos knock-out y knock-out condicionales para PKM ζ mostraron no tener ningún efecto sobre LTP ni el aprendizaje y la memoria (Lee et al., 2013; Volk et al., 2013). Además, mostraron que la inyección del inhibidor ZIP en estos animales tenía un efecto amnésico, por lo que fue una de las primeras evidencias sugiriendo que todos los trabajos anteriores en los que se vieron déficits tanto en plasticidad como a nivel comportamental se podrían atribuir a efectos inespecíficos de ZIP sobre otras enzimas, entre ellas la isoforma PKC γ y CaMKII (Cao et

al., 2008). De todos modos, Shema y colaboradores (Shema et al., 2011) reportaron que la sobreexpresión mejora la retención en el paradigma de *Conditioned Taste Aversion* y además mostró que hay aumento de proteína hasta 7 días post-TR en corteza insular.

Recientemente, se encontró que en el hipocampo la proteína CPEB3 participa de la formación y mantenimiento de la MLT. Esta proteína regula la traducción local de ARNm en espinas, induciendo en particular, la traducción local de receptores glutamatérgicos (Fioriti et al., 2015).

A partir de los antecedentes mencionados aquí, queda de manifiesto entonces que, luego de la consolidación de la memoria hay mecanismos moleculares activos, tales como expresión génica, síntesis de proteínas, traducción local en espinas, activación de quinasas y cambios en el número de receptores glutamatérgicos, necesarios para que la MLT persista en el tiempo. Por otro lado, en nuestro laboratorio, vimos que la acetilación de histonas durante la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos es un mecanismo molecular que participa específicamente de la formación de memorias de largo término persistentes (Federman et al., 2013). Esta evidencia aporta dos datos relevantes: i) los mecanismos epigenéticos también definen la duración de la MLT en el tiempo, ii) existen mecanismos moleculares durante la consolidación que regulan la permanencia en el tiempo de la MLT en formación.

En base a lo expuesto anteriormente, nos referiremos a procesos que afectan la formación de MLT persistentes, como a aquellos mecanismos que tienen lugar durante la consolidación y que afectan específicamente la formación de una MLT duradera. Cuando nos refiramos a procesos que tienen lugar una vez que la MLT se encuentra consolidada, diremos que estos afectan el mantenimiento de la MLT. Por otro lado, queremos distinguir los términos *persistencia de la memoria*, de *mantenimiento de la memoria*, aclarando que el primero se refiere a una característica intrínseca de la memoria, mientras que el segundo se refiere a un proceso que afecta MLTs ya consolidadas.

I.9 CONSOLIDACIÓN SISTÉMICA

Al poco tiempo del descubrimiento de la consolidación de la MLT, se definió el concepto de *consolidación sistémica* para explicar el fenómeno que daba lugar a la formación de memorias remotas (MRs) que son aquellas que duran tiempos tan prolongados como meses o toda una vida. Esta forma de consolidación involucra la reorganización de los circuitos cerebrales y la comunicación entre distintas regiones, de allí que se denomine *sistémica* (Squire et al., 2015). La consolidación estudiada en los puntos anteriores involucra cambios en la eficacia sináptica y por ello a este tipo de

proceso se lo denomina *consolidación sináptica*, distinguiéndola así de la consolidación sistémica. El **modelo de consolidación sistémica** indica que los recuerdos de las memorias declarativas son inicialmente dependientes del hipocampo pero que gradualmente se hacen independientes de esta estructura y pasan a ser dependientes de otras estructuras dentro de la corteza cerebral, como la corteza prefrontal medial y la corteza cingulada anterior (Figura I.9.i, Frankland and Bontempi, 2005). Este proceso de transferencia de información entre estructuras tendría lugar durante semanas, meses e incluso años.

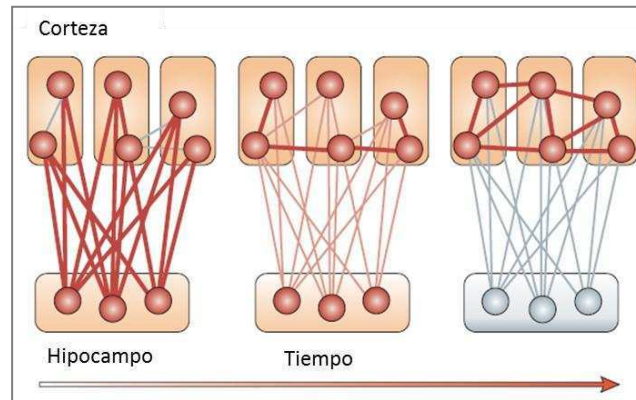


Figura I.9i: Modelo de Consolidación Sistémica. La codificación de información perceptual, motora y cognitiva ocurre inicialmente en zonas primarias especializadas y estructuras corticales asociativas. Esta información es integrada en el hipocampo y las concatena de manera de generar una traza mnésica coherente. La actividad reverberante entre el hipocampo y corteza lleva a que la nueva traza mnésica se integre a las trazas pre-existentes en corteza, de manera tal que gradualmente esta se hace independiente del hipocampo y dependiente de estructuras corticales superiores. Adaptado de (Frankland and Bontempi, 2005).

I.9.1 Mecanismos moleculares

Los mecanismos moleculares implicados en el proceso de consolidación sistémica son similares a los observados durante la consolidación y persistencia de la memoria en cuanto a que requieren de expresión génica, activación de receptores glutamatérgicos y quinasas. Pero hay dos observaciones llamativas que la distinguen: i) los eventos moleculares que tienen lugar en el hipocampo durante la primera semana luego del entrenamiento son claves para que la consolidación sistémica tenga lugar (Frankland and Bontempi, 2005), ii) los entrenamientos que son lo suficientemente fuertes como para inducir la consolidación sistémica suelen estar acompañados de cambios epigenéticos tanto en el hipocampo como en estructuras de la corteza (Walters and Zovkic, 2015; Zovkic et al., 2014). Esto destaca la importancia de los procesos moleculares que tienen lugar luego de la consolidación en el hipocampo y de los mecanismos epigenéticos que inducirían cambios sostenidos en la expresión de genes

claves para estos procesos, tales como los mencionados anteriormente (BDNF, CaMKII α , ZIF268, etc).

I.10 CONTROL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.

La mayor parte de las células especializadas de un organismo pluricelular son capaces de alterar su patrón de expresión génica como respuesta a señales extracelulares. Un ejemplo de esto son las neuronas, cuya expresión génica puede ser modulada por la liberación de neurotransmisores en la pre-sinapsis y la experiencia comportamental, tal como se comentó en las secciones anteriores.

Dada la relevancia de la expresión génica y la síntesis de proteínas durante la consolidación, la consolidación sistémica y el mantenimiento de la MLT, a continuación estudiaremos los mecanismos que las regulan.

Partiendo de un gen de interés, existen diversos pasos regulatorios que controlan los niveles de expresión de su producto proteico. Considerando el camino de expresión del ADN a la proteína, tenemos que un primer punto de control es a nivel transcripcional **(1)**, regulándose cuándo se da inicio a la transcripción de un gen y cuantas copias de ARN se producirán. Luego, le sigue el control del procesamiento de este ARN hacia un ARN maduro **(2)**; el transporte y localización del ARN hacia los sitios de interés **(3)**; el control de su traducción a proteína **(4)**; la degradación del ARNm **(5)** y por último las modificaciones post-traduccionales que afectan la actividad de la proteína resultante, su nivel de degradación y/o compartimentalización **(6)** (Alberts et al., 2002).

Dado que la expresión génica es un componente necesario para la formación y mantenimiento de la MLT (sección I.6 a I.9) y su regulación en estos procesos neurobiológicos es uno de los puntos de interés de esta tesis, los niveles de estudio y experimentación estarán destinados al análisis del rol de algunos de los pasos de control mencionados anteriormente en la regulación de un gen y en su vínculo con la MLT evidenciado a nivel comportamental. Entre todos los pasos regulatorios mencionados anteriormente, el más influyente en la expresión de la mayoría de los genes es el **control del inicio de la transcripción (1)**, ya que éste es el único que evita la síntesis de intermediarios innecesarios y por ello es el nivel de regulación elegido como punto de análisis en esta tesis. A continuación desarrollaremos los conceptos asociados a este fenómeno molecular en células eucariotas. En primer lugar describiremos la estructura y empaquetamiento del ADN, y luego como estas sirven de base para la regulación de la transcripción.

I.10.1 Estructura génica y empaquetamiento del ADN.

El gen

Los **genes** están constituidos por una región que contiene la secuencia de ADN que codifica para la proteína en cuestión y una región **promotora**, que se inicia aproximadamente 1000 pares de bases río arriba del gen y que contiene las secuencias regulatorias necesarias para dar lugar a la transcripción del gen (figura I.10i, (Alberts et al., 2002). Además poseen un **sitio de inicio de la transcripción (SIT)**, que, tal como lo indica su nombre, es el sitio que da inicio a la transcripción del gen. El SIT varía de gen a gen, pero experimentalmente se descubrió que coincide con la secuencia que codifica para el extremo 5' del ARNm, y por lo tanto actualmente la forma práctica de determinar el SIT de un gen es a partir de la identificación de esta secuencia en su ARNm (Lodish et al., 2000).

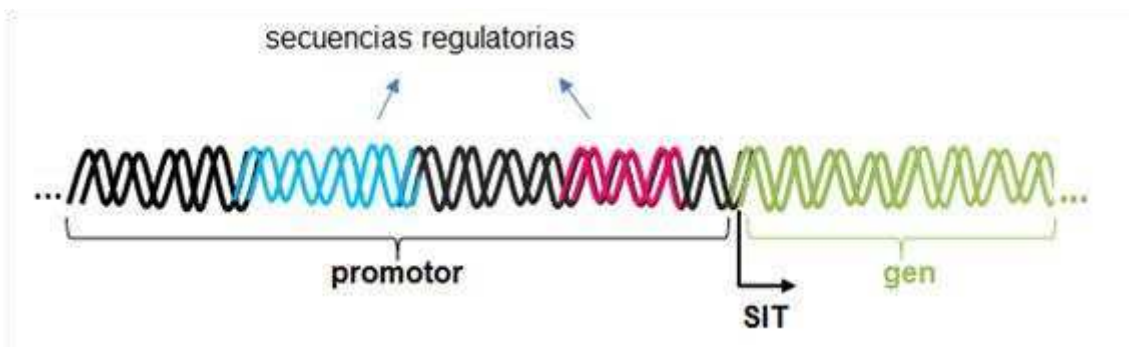


Figura I.10i. Estructura general de los genes.

Empaquetamiento del ADN

El ADN en los núcleos de las células se encuentra densamente empaquetado formando estructuras denominadas *cromosomas*. Estos cromosomas son estructuras dinámicas que poseen regiones de alta condensación y otras de baja condensación que modulan la expresión génica, entre otros procesos. El empaquetamiento se logra en primer lugar gracias a la unión del ADN a unas proteínas denominadas **histonas**. Ocho de estas histonas se unen para formar un **nucleosoma** en torno al cual se empaqueta una porción de ADN de 146 ± 2 pares de bases (pb) de longitud

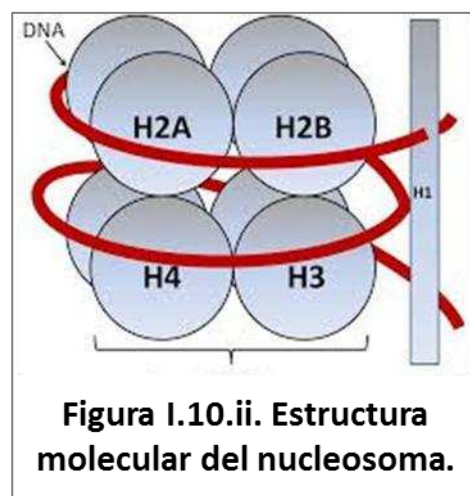


Figura I.10.ii. Estructura molecular del nucleosoma.

enrollándose 1,65 vueltas alrededor del octámero (figura I.10ii). Este complejo núcleo-proteico se repite esencialmente cada 200 ± 40 pb a lo largo del genoma en células eucariotas (Zlatanova et al., 2009). Existen varias clases de histonas; las proteínas canónicas que conforman el octámero son las histonas H3, histona H4, histona H2A e histona H2B. Los nucleosomas se organizan, a su vez, en estructuras de órdenes más altos. El siguiente orden se genera al unirse la histona H1 al ADN conector, el cual es la porción de ADN libre entre nucleosomas. Y así, la unión de diferentes proteínas va ensamblando al ADN a distintos niveles de compactación.

I.10.2 Control de la transcripción: Secuencia de ADN.

La transcripción general de ADN a ARN es mediada por la ARN polimerasa II (ARN Pol II) y los factores generales de transcripción de la polimerasa II (FGTII), entre otras proteínas. Los FGTII reconocen diversas secuencias consenso regulatorias, como la secuencia TATA BOX, que se encuentran generalmente río arriba del sitio de inicio de la transcripción y se unen a éstos. Esta unión produce una distorsión en el ADN que permite el ensamblaje del resto de las proteínas, entre ellas la ARN Pol II, formando el *complejo de inicio de transcripción*.

Además de las secuencias regulatorias que son reconocidas por el *complejo de inicio de transcripción* general, existen otras regiones reguladoras, denominadas **enhancers** que pueden ubicarse hasta varios miles de pb río arriba del SIT y que son reconocidas de manera específica por proteínas activadoras o represoras de la transcripción. Estas regiones le otorgan especificidad a la transcripción de ciertos genes por sobre los miles posibles, ya que, por ejemplo, la activación de una de estas proteínas que se unen al ADN solo afectará la transcripción de aquellos genes que contengan la secuencia reguladora específica río arriba de su SIT. Un ejemplo de estas proteínas reguladoras de unión al ADN son los factores de transcripción (FT) como CREB, NF- κ B y ZIF268, que se unen a secuencias específicas de ADN atrayendo a la ARN Pol II hacia el punto SIT.

Las proteínas de unión al ADN poseen motivos estructurales tales como hélice-giro-hélice, dedos de zinc y cremalleras de leucina entre otros, que permiten su unión al surco mayor de la doble hélice de ADN (Alberts et al., 2002).

I.10.3 Control de la transcripción: Epigenética

El término *epigenética* fue utilizado por primera vez por Waddington (Waddington, 1957), para responder al problema de cómo hacen células de un mismo organismo,

por ejemplo células del hígado y del músculo, para ser tan distintas si tienen exactamente la misma secuencia de nucleótidos (con excepción de algunas células de su sistema reproductivo y otras pocas de su sistema inmune) en todo su genoma. Waddington acuñó el término epigenética para conceptualizar a aquellos mecanismos que se encuentran río arriba de la lectura de secuencia de nucleótidos de un gen, en el genoma de esas células y que la controlan. Entonces, se denominan **marcas epigenéticas** a aquellas **modificaciones en la estructura de la cromatina que afectan la transcripción de los genes en cuya secuencia se encuentran**. Estas marcas pueden ser modificaciones **post-traduccionales (MPTs) de histonas**, en las que se le unen covalentemente diferentes grupos químicos, como la acetilación, fosforilación, metilación, ubiquitinación y sumolación, así como también **cambios en los patrones de metilación de los residuos de citosina del ADN**. La mayoría de estas modificaciones tienen lugar en la región promotora del gen, y en el gen propiamente dicho, en localizaciones altamente reguladas, ya que son cruciales para los procesos de transcripción (entre otros) (Li et al., 2007).

Otros mecanismos epigenéticos incluyen remodelación de nucleosomas y de cromatina de más alto orden, generación de ARN no codificante, edición de ARN y recodificación de ADN (Mehler, 2008).

Estas definiciones son útiles para entender que durante la transcripción de un determinado gen, no sólo importa la presencia o ausencia de ciertas secuencias en las regiones regulatorias del gen sino también el estado de la estructura de la cromatina en dichas regiones.

I.10.4 Control de la transcripción: Empaquetamiento del ADN.

Otro punto de regulación de la transcripción se da a través de las proteínas que afectan el grado de empaquetamiento del ADN en torno al gen de interés ya que éste afecta el acceso de la maquinaria de transcripción al mismo.

El complejo formado por el ADN, las histonas y otras proteínas cromosómicas se denomina *cromatina*. El grado de empaquetamiento puede alcanzar estructuras tan densas que se torna impenetrable para las proteínas involucradas en los procesos transcripcionales y en consecuencia los genes dentro de estas regiones no se expresan. Este tipo de cromatina altamente compactada e inactiva se denomina *heterocromatina*. Existen otras regiones del cromosoma, donde la cromatina se encuentra menos condensada, con zonas abiertas y de transcripción activa; se denomina *eucromatina* (Alberts et al., 2002).

I.11 MPT DE HISTONAS Y POSICIONAMIENTO NUCLEOSOMAL

Dentro de las regiones de la eucromatina, el grado de expresión de un gen depende en mayor medida de las modificaciones post-traduccionales presentes en las histonas y de la naturaleza y posicionamiento de los nucleosomas que se encuentran en la región que servirá de ensamblaje para las proteínas que participan de su transcripción, entre otros (Brown, 2002). Las primeras evidencias de los efectos de los nucleosomas y sus histonas sobre la expresión génica data del 1980, en el que se observó que los nucleosomas impiden la transcripción *in-vitro* (Knezetic and Luse, 1986; Lorch et al., 1987) y que la delección total o parcial de histonas tiene efectos específicos sobre la expresión *in vivo* (Han and Grunstein, 1988; Kayne et al., 1988).

La idea general es que **la presencia de nucleosomas modula la transcripción mediante la introducción de cambios en la compactación del ADN** (dando lugar a estructuras más o menos condensadas) **y la ocupación de sitios reguladores de la transcripción**. Mientras que las **modificaciones post-traduccionales de histonas**, además de afectar **la unión histona-ADN y en consecuencia la accesibilidad y compactación del mismo**, se destacan principalmente por su capacidad para atraer específicamente determinadas proteínas hacia la región de la cromatina que ha sido modificada convenientemente de manera tal de **proveer una plataforma para la unión de factores** de transcripción y cofactores adicionales que reconocen la modificaciones post-traduccionales de las histonas dentro del nucleosoma (Alberts, 2002). Estos mecanismos mencionados no son necesariamente mutuamente excluyentes, y puede darse que una misma modificación post-traduccionales tenga efecto simultáneamente sobre la accesibilidad del ADN y su reconocimiento por proteínas remodeladoras.

Dada la relevancia de ambos procesos en la regulación de la expresión génica, en los últimos años, muchos laboratorios se avocaron a estudiar cómo estos procesos estarán influenciando la expresión génica que tiene lugar durante la formación y mantenimiento de la MLT. A continuación, describiremos los eventos moleculares involucrados y luego daremos a conocer la evidencia que las vincula con procesos mnésicos.

I.11.1 MPTs de Histonas

La figura I.11i muestra un resumen de la distribución de histonas (y en consecuencia nucleosomas) e histonas con MPT dentro de un gen y promotor arbitrarios. Los datos

son una recopilación de estudios genómicos a gran escala en levaduras, pero son una buena aproximación de lo que ocurre en sistemas eucarióticos más complejos (Li et al., 2007).

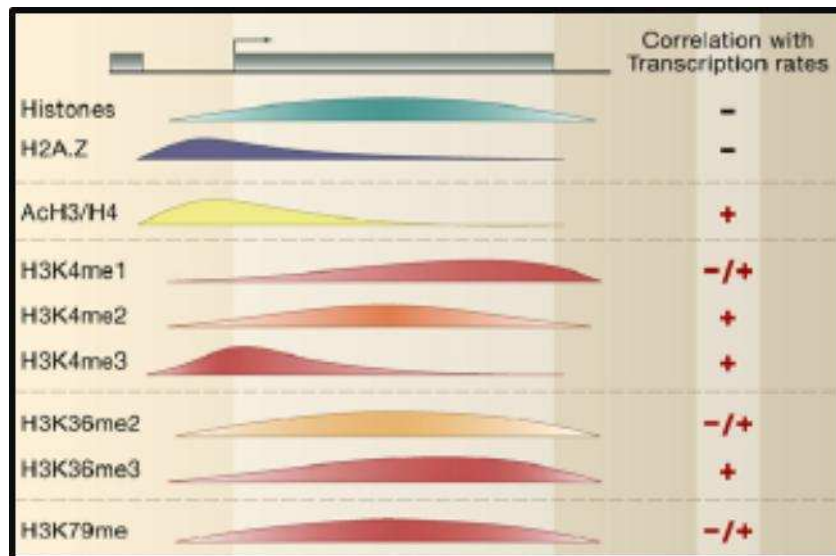


Figura I.11i. Frecuencia de MPTs de histonas en distintas regiones de un gen y su relación con la tasa de transcripción (Li et al., 2007).

La figura muestra que en general la presencia de histonas es mayor dentro de la región codificante del gen que en sus extremos, sobre todo en el promotor. Sin embargo, las histonas presentes en la región promotora tienen una alta probabilidad de sufrir MPTs como acetilación (AcH3/H4) y metilación (H3K4me3). Esto sugiere, que si bien la densidad de histonas es menor, estas están altamente reguladas y podrían tener efectos significativos en la expresión génica.

Las enzimas que llevan a cabo estas MPTs de histonas son acetilasas y desacetilasas de histonas (HATs y HDACs, respectivamente por sus singlas en inglés *histone-acetyl-transferase* y *histone-deacetyl-transferase*), metil-transferasas y demetilasas (HMT y HDM, respectivamente por sus singlas en inglés *histone-methyl-transferase* y *histone-demethylase*). Si bien como se mencionó anteriormente, estas no son las únicas MPTs posibles, son las más estudiadas, probablemente por tener un efecto más relevante sobre la expresión génica o porque son las que ocurren con mayor frecuencia.

Las acetilaciones en los residuos de lisina disminuyen la carga positiva sobre las histonas lo que reduce su fuerza de interacción con el ADN que presenta carga negativa favoreciendo así la accesibilidad o el remodelamiento de esta porción de ADN (Reinke and Hörz, 2003; Zhao et al., 2005). La di- y tri- metilación de la histona H3 en la lisina 4 están asociadas con la activación transcripcional. Estas MPT se denominan comúnmente *modificaciones eucromatinicas* y otras modificaciones, tales como la

metilación de la histona H3 en la lisina 9 y 27 que se localiza en zonas transcripcionales inactivas, son denominadas modificaciones *heterocromatinicas*.

I.11.2 Remodelamiento nucleosomal.

El proceso por el cual un nucleosoma modifica su naturaleza o posición se denomina *remodelamiento nucleosomal*. Este proceso epigenético involucra por lo menos cuatro formas de transformación distintas (figura I.11i):

1. Desplazamiento del nucleosoma hacia una nueva posición que expone o no el ADN.
2. Eyección de un nucleosoma entero, lo que deja esa región de ADN al descubierto.
3. Eyección de los dímeros H2A-H2B, dejando solo el tetrámero principal de H3 y H4 que expone el ADN y desestabiliza al nucleosoma.
4. Reemplazo de los dímeros H2A-H2B por las variantes H2A.Z-H2B o la histona H3 por la variante H3.3.

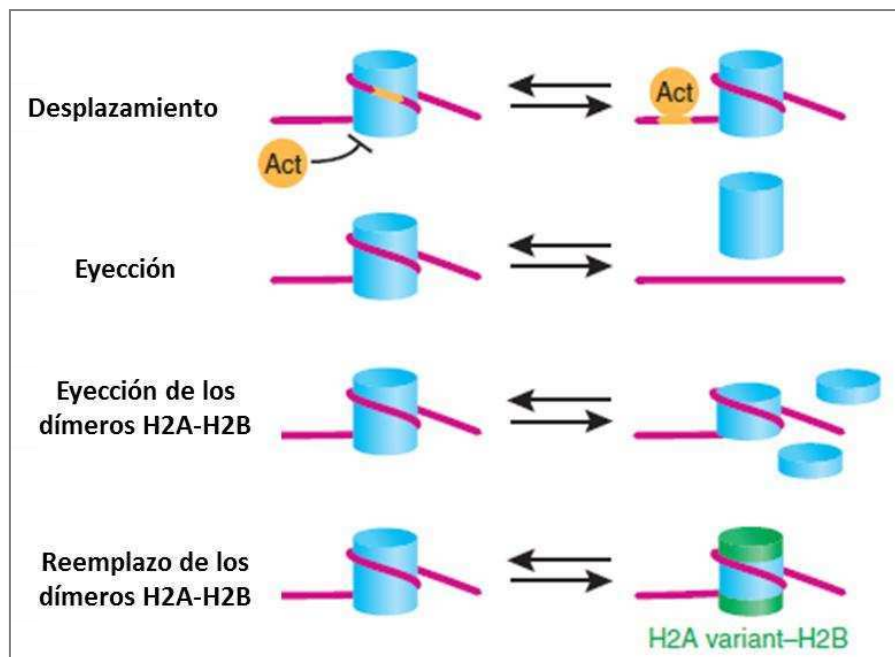


Figura I.11i. Transformaciones inducidas por el remodelamiento nucleosomal (Cairns, 2007).

Estas transformaciones son energéticamente muy costosas. En particular el desplazamiento y la remoción de un nucleosoma entero requiere romper todas las uniones ADN-Histona, lo que tiene un gasto energético elevadísimo y en ausencia de proteínas que asistan estos procesos tendrían una dinámica muy lenta (Teif et al., 2013). Para permitir un acceso rápido y regulado al ADN que dé lugar a los procesos de transcripción y replicación necesarios pero sin afectar el orden topológico conferido por los nucleosomas, las células poseen una maquinaria de proteínas remodeladoras de nucleosomas que afectan el posicionamiento nucleosomal, su presencia y su estructura (Cairns, 2007). El complejo remodelador de nucleosomas (CRN) incluye principalmente **complejos multiproteicos dependientes de ATP** que consumen ATP para llevar a cabo las transformaciones mencionadas anteriormente. Las reacciones que asisten tardan segundos o minutos (Chereji and Morozov, 2015). Los complejos remodeladores más estudiados en el sistema nervioso son SWI/SNF, NuRD, y nBAF entre otros (López and Wood, 2015a). El complejo SWI/SNF tiene la capacidad de romper uniones ADN-histona e introducir pequeñas torsiones en el ADN liberado que favorecen el desplazamiento o eyección del nucleosoma. Se ha observado que en algunos casos para que la acción del complejo remodelador tenga efecto sobre la expresión génica es necesario su asociación a HATs en la región de ADN en cuestión. El complejo NuRD posee en su estructura varias desacetilasas (HDAC1, HDAC2), por lo que nuevamente su acción involucra este tipo de MPTs en las histonas en cuestión. Este complejo reconoce MPTs de histonas y está asociado al silenciamiento génico. El complejo nBAF es el homólogo de SWI/SNF que se expresa exclusivamente en neuronas. Una de las subunidades más relevantes del complejo nBAF es Baf53b ya que ésta, además de expresarse exclusivamente en neuronas, lo hace sólo en neuronas post-mitóticas y se ha observado que su expresión es vital para permitir el desarrollo a neuronas adultas (López and Wood, 2015a). La figura I.11ii muestra las proteínas que componen al complejo nBAF.

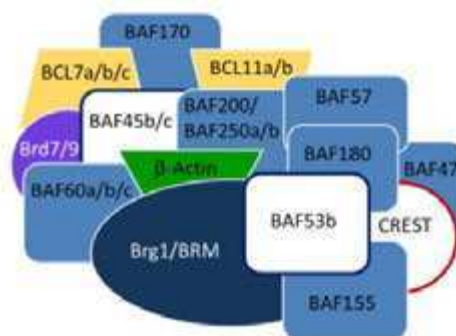


Figura I.11ii. Factor Asociado Brg1/BRM específico de neuronas (nBAF). Modelo propuesto para las subunidades que conforman el complejo. Las subunidades en blanco son específicas de neuronas (López and Wood, 2015a).

Además de la acción de proteínas remodeladoras, se proponen otros mecanismos que no necesariamente llevan a su remodelamiento, pero si determinan la posición de un nucleosoma en cierta región del ADN.

Maquinaria basal de transcripción

Se ha observado que el posicionamiento del nucleosoma +1 (el primero contando desde el SIT) es dependiente de la unión del complejo de iniciación de la transcripción (Struhl and Segal, 2013). Además, la presencia de los FTs en sus regiones enhancers suele verse acompañada por la translocación conjunta con acetilasas que serían necesarias para permitir la acción remodeladora de los CRN. Varios estudios bioquímicos han demostrado que la unión cooperativa de los FGT y la ARN Pol II afecta la unión ADN-histona favoreciendo el desplazamiento de nucleosomas y por ende el remodelamiento nucleosomal (Workman and Kingston, 1992; Adams and Workman, 1995; Owen-Hughes and Workman, 1996; Kireeva et al., 2002; López and Wood, 2015a).

Secuencia de ADN

La secuencia de ADN tiene cierta influencia sobre el posicionamiento del nucleosoma. Se ha observado que dada una secuencia de 147 pb, los valores de afinidad medidos son muy variables, habiendo hasta tres órdenes de magnitud de diferencia entre unos y otros, lo que refleja que no se trata de un fenómeno estocástico, sino de una afinidad secuencia-específica (esta especificidad es menor a la observada en las proteínas de unión al ADN - FTs mencionadas anteriormente) (Struhl and Segal, 2013). Sin embargo, esta especificidad no viene dada por la energía de unión de unas pocas interacciones directas sino por la habilidad de la secuencia en cuestión de acomodarse como un todo alrededor del octámero de histonas.

A partir de lo expuesto anteriormente, es evidente que no puede asociarse la expresión génica a una modificación epigenética aislada. La cooperatividad es clave estos procesos.

I.11 MECANISMOS EPIGENÉTICOS EN LA MLT.

En las primeras secciones, se discutió que los procesos moleculares subyacentes a la formación y persistencia de la MLT requieren de la expresión génica, y en la sección anterior vimos los mecanismos más relevantes que la regulan. En esta sección, veremos los antecedentes que estudian cómo los cambios a nivel transcripcional introducidos por mecanismos epigenéticos afectan la MLT.

Los mecanismos epigenéticos más estudiados en procesos mnésicos son las modificaciones post-traduccionales de histonas, el intercambio de variantes de histonas, la acción de proteínas remodeladoras y la metilación de ADN (Guan et al., 2015; Zovkic and Sweatt, 2015).

MPTs de histonas

La participación de mecanismos epigenéticos tales como acetilación, fosforilación y metilación de histonas, ha sido descrita en procesos de plasticidad neuronal a largo término en invertebrados, y en la consolidación y reconsolidación de la memoria en invertebrados y vertebrados (Alarcón et al., 2004; Korzus et al., 2004; Levenson et al., 2004; Wood et al., 2005, 2006; Federman et al., 2012 revisado por Guan et al., 2015). Por ejemplo, la acetilación de la histona H3 en hipocampo ha sido asociada a la formación de la memoria de miedo condicionado en roedores (Levenson et al., 2004; Bredy et al., 2007; Lubin et al., 2008) y la disrupción de la actividad de las acetilasas de lisinas CBP y otras, interfiere con la formación de la memoria (Alarcón et al., 2004; Korzus et al., 2004; Maurice et al., 2008). Por otro lado, se ha demostrado que la inhibición de la actividad de las HDACs facilita la memoria en modelos de roedores (Levenson et al., 2004; Vecsey et al., 2007; Yeh et al., 2004; Fischer et al., 2007), así como también revierte los déficits de memoria inducidos por manipulaciones genéticas en el gen de CBP (Alarcón et al., 2004; Korzus et al., 2004). También se ha mostrado que la sobreexpresión en neuronas de la deacetilasa HDAC2 obstruye la plasticidad sináptica y la formación de la memoria (Guan et al., 2009).

Algunos de estos estudios fueron realizados sobre promotores específicos, mostrando que estas modificaciones post traduccionales (MPTs) de histonas pueden regular la transcripción de genes asociados con plasticidad durante la consolidación, tales como factores de transcripción (por ejemplo, C/EBP β), receptores de neurotransmisores excitatorios y neuromoduladores, proteínas del citoesqueleto, moléculas de adhesión celular y enzimas metabólicas (Levenson and Sweatt, 2005; Wood et al., 2006; Federman et al., 2013).

Las evidencias indican que las acetilasas regularían positivamente la formación de la MLT, mientras que lo contrario ocurriría frente a la activación de las desacetilasas.

Intercambio de histonas

Dos trabajos recientes han demostrado que el intercambio de histonas puede regular positiva- o negativamente la expresión de diversos genes en procesos mnésicos. En particular se vio que diversos entrenamientos comportamentales inducen cambios en la presencia de histonas H3.3 y H2A.Z en el nucleosoma. La incorporación de H3.3 regularía positivamente la formación de memoria durante las tareas de aprendizaje de

reconocimiento novedoso y condicionamiento de miedo (Maze et al., 2015), mientras que la incorporación de H2A.Z tendría efectos negativos sobre la consolidación de la memoria de miedo e introduciría modificaciones moleculares estables en el tiempo (Zovkic et al., 2014). Estos trabajos demuestran que el intercambio de histonas puede tener efectos diversos en la expresión génica y formación de la MLT, en función de tipo de histona en cuestión.

Complejo Remodelador de Nucleosomas

Por otro lado, otro de los mecanismos que está cobrando relevancia es el estudio de las proteínas remodeladoras de nucleosomas dependientes de ATP (López and Wood, 2015b). Los trabajos del laboratorio de Wood han sido pioneros en este tema. Estos indican que la proteína BAF53b regula positivamente la formación de la MLT (Vogel-Ciernia and Wood, 2014).

I.12 MEMORIA DE RECONOCIMIENTO DE OBJETOS:

I.12.1 Familiaridad, Recolección y Temporalidad.

La **memoria de reconocimiento** (MR) es la habilidad de discriminar un estímulo o evento novedoso de uno familiar, experimentado previamente (Kinnavane et al., 2015). Desde un punto de vista neurobiológico, definiremos a la **memoria de reconocimiento** como a los procesos neuronales por los cuales un sujeto da cuenta de que un estímulo fue previamente experimentado y se denomina **reconocimiento** al comportamiento que resulta de estos procesos (T Steckler et al., 1998). Este tipo de memoria se encuentra conservada entre distintas especies de animales incluido el humano y por ello es un importante campo de estudio dentro de la investigación neurocientífica. En el caso de la **memoria de reconocimiento de objetos** (MRO), se requiere que las características que se perciben de un objeto en un entorno dado sean contrastadas, identificadas y comparadas contra las características de un objeto experimentado previamente en ese u otro entorno.

Se propone que este tipo de memoria involucra al menos tres componentes o procesos distinguibles: la familiaridad, la recolección y la temporalidad (Yonelinas et al., 2002; Brown and Banks, 2015; Kinnavane et al., 2015). La **familiaridad** se refiere al hecho de reconocer un estímulo que fue previamente presentado por sus características individuales, es decir sin información del entorno o contexto en el cual fue presentado. En el caso de la MRO, el concepto de familiaridad se refiere a reconocer el objeto independientemente del contexto. **Recolección** en cambio, hace alusión a recordar detalles contextuales espacio-temporales específicos de la experiencia previa. Estos dos componentes establecen, en principio, dos rutas distintas

para llegar al reconocimiento de un ítem. Por ejemplo, imaginemos que estamos de viaje y se acerca una persona a saludarnos, nosotros reconocemos haberla visto previamente pero no podemos terminar de identificarla. En este caso, la reconocimos gracias a la componente de familiaridad de nuestra memoria de reconocimiento. Sin embargo, si al mismo tiempo nos damos cuenta que se trata de un investigador colega con el que nos habíamos quedado charlando al final del último congreso de la Sociedad Argentina de Neurociencias, estaremos haciendo uso del componente de recolección. Finalmente, la componente de **temporalidad** (*recency*, en inglés) es la habilidad de distinguir entre dos estímulos o eventos en función del orden temporal en el que fueron presentados (Kinnavane et al., 2015).

I.12.2 El paradigma de Reconocimiento de Objeto Novedoso

El paradigma de **reconocimiento de objeto novedoso** (NOR, por sus siglas en inglés *Novel Object Recognition*) fue diseñado en 1988 por Ennaceur y Delacour y se ha convertido en uno de los paradigmas más populares en el estudio de la memoria de reconocimiento de objetos debido a su simpleza y versatilidad (Ennaceur and Delacour, 1988; Kinnavane et al., 2015). El paradigma evalúa la capacidad de un animal de reconocer un objeto novedoso en un contexto dado y toma ventaja, básicamente, de dos características de los roedores: la tendencia natural de estos animales a explorar un objeto que no ha experimentado previamente y el cual, se asume, no tiene significancia particular para el animal y nunca ha sido asociado con un refuerzo, y la preferencia innata a investigar un objeto novedoso por sobre un objeto familiar (Aggleton, 1985).

El protocolo consiste de tres *sesiones de habituación* a un contexto o caja experimental, seguida de una *sesión de entrenamiento* en la cual se coloca al animal dentro de la caja experimental que ahora contiene dos objetos idénticos, ubicados tal como se indica en la figura I.12iA, y una *sesión de evaluación o testeo* en la cual uno de los objetos es intercambiado por otro distinto, no experimentado previamente, es decir, novedoso. Durante la sesión de entrenamiento los animales exploran los objetos presentes en la caja y así extraen (o retienen) características del objeto y del objeto en el contexto. Durante la sesión de testeo, se evalúa la retención de la memoria por el objeto presentado durante la sesión de entrenamiento y para ello se mide la exploración de ambos objetos. Dado que los roedores tienen una preferencia innata por explorar objetos novedosos sobre objetos familiares, cuando el tiempo de exploración del objeto novedoso es mayor al tiempo de exploración del objeto familiar nos indica que se ha podido reconocer al objeto presentado durante la sesión de entrenamiento, y de este modo este parámetro nos permite evaluar la memoria de reconocimiento de objetos (Ennaceur, 2010).

A lo largo de los años, se han introducido diversas variantes al protocolo original que permiten estudiar las distintas componentes de reconocimiento por separado. Por ejemplo, durante la sesión de evaluación, en lugar de cambiar la identidad del objeto, sencillamente se puede cambiar su ubicación y de este modo, dado que la familiaridad entre ambos objetos es la misma, lo que se evalúa es la componente de recolección, es decir que se reconoce al objeto novedoso por su nueva localización (figura I.12iB, Ameen-Ali et al., 2015; Morici et al., 2015). También se han diseñado variantes que permiten evaluar la componente de temporalidad ya que la novedad del objeto viene dada por el orden temporal en el que fue presentado (figura I.12iC, Morici et al., 2015). En esta tesis se empleó la versión original del paradigma (figura I.12iA) que, en principio, evalúa la memoria de reconocimiento como un todo. El procedimiento empleado se detalla en la sección III correspondiente.

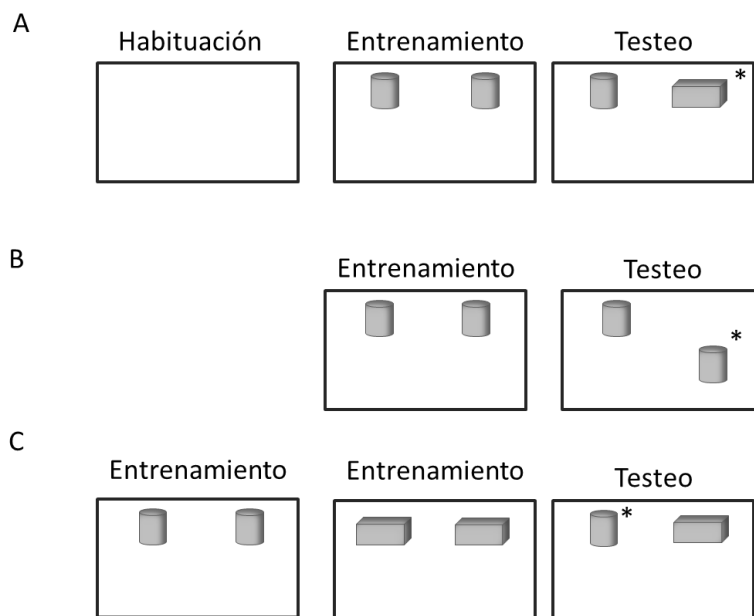


Figura I.12i. Variantes del paradigma de reconocimiento de objetos. A. Reconocimiento de Objetos Novedoso o espontáneo. B. Localización Objeto-Lugar (en inglés, Object-Location Task). C. Discriminación Temporal. El asterisco indica el objeto o configuración novedoso/a y que se espera sea el más explorado por el animal en el testeo.

La ventaja de este paradigma sobre otros posibles y que lo ha hecho tan popular para evaluar la memoria de reconocimiento radica en que: i) evalúa la memoria de reconocimiento de objetos de manera simple y permite estudiar sus distintas componentes, ii) el animal explora los objetos espontáneamente sin necesidad de incorporar una motivación externa mediante un estímulo apetitivo o aversivo, iii) el animal logra construir una representación del objeto y el objeto en el contexto con

poco entrenamiento, iv) el protocolo es sencillo, y cambiando la duración de la sesión de entrenamiento, y el intervalo entre ésta y la sesión de testeo, pueden estudiarse procesos implicados en memorias de corto término, de largo término y memorias persistentes (Antunes and Biala, 2012; Ameen-Ali et al., 2015). Además, el uso de éste modelo es más apropiado para aproximaciones que utilizan intervenciones farmacológicas y/o genéticas, ya que no afecta el nivel de estrés, ansiedad o atención del animal, que confundiría los efectos de una droga o de la eliminación de un gen (Dere et al., 2007).

I.13 ESTRUCTURAS INVOLUCRADAS EN LA MRO EN ROEDORES

I.13.1 Sustratos neuroanatómicos en roedores

La figura figura I.13i, (T. Steckler et al., 1998), muestra la conectividad entre los principales sustratos neuroanatómicos involucrados en el reconocimiento de objetos. Lo que se observa es que las proyecciones que llevan información relativa a las modalidades sensoriales implicadas en el reconocimiento de objetos convergen hacia la corteza perirrinal, entorrinal y la formación hipocampal y es por ello que estas tres son las estructuras del lóbulo temporal que se sugiere estarían implicadas en la formación de la memoria de reconocimiento.

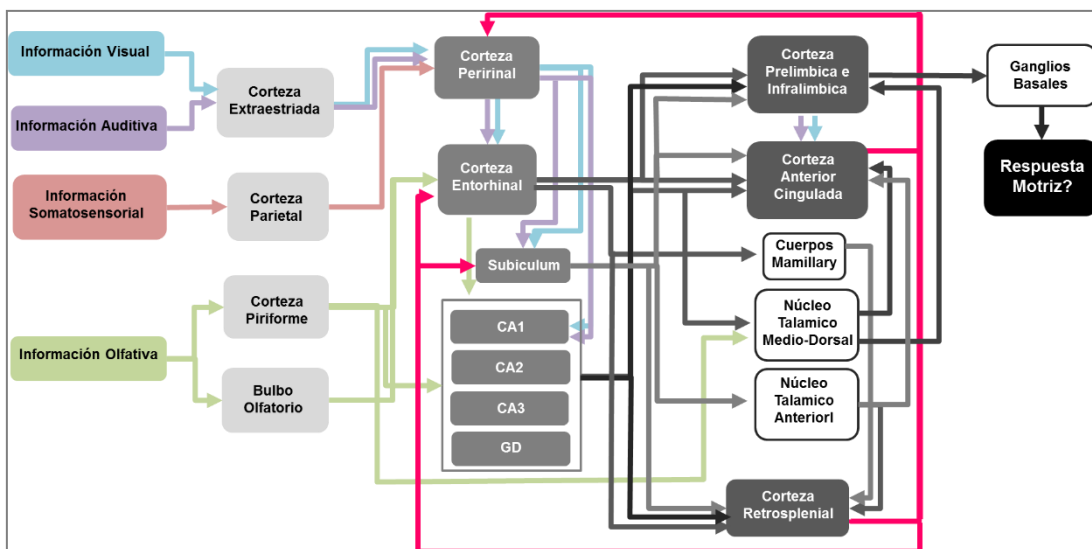


Figura I.13i. Sustratos neuroanatómicos de la memoria de reconocimiento de objetos (adaptado de T. Steckler et al., 1998).

Ahondaremos un poco más en la función de estas estructuras y su relación con la MRO en roedores.

Corteza Extraestriada y áreas sensoriales. La *corteza extraestriada* incluye el área temporal y parte de la visual y auditiva. Esta corteza no recibe la información sensorial de manera directa sino a través de los núcleos talámicos donde se produce un pre-procesamiento de esta (Paxinos and Puelles, 2012). Las lesiones en la corteza extraestriada o su inactivación farmacológica inducen déficits en la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos pero no en su adquisición, dado que la memoria de corto termino no se ve afectada (Ho et al., 2011). Por otro lado, se observó que en esta región, la exposición a objetos novedosos induce la actividad neuronal y la expresión del gen de respuesta temprana c-fos aumenta luego del entrenamiento (Zhu et al., 1995; T. Steckler et al., 1998; Aggleton et al., 2012). La *corteza parietal* es un centro de integración multi-sensorial que posee una región interna especializada en el procesamiento de la información somatosensorial. Dentro de esta a su vez, existe una región que procesa la información proveniente de la exploración que el animal hace con las vibrisas (denominada en inglés *barrel cortex*) y que ha sido motivo de muchos estudios debido a su elevado orden topológico que permite adquirir e integrar la percepción sensorial proveniente de cada una de las vibrisas que posee el animal (Akers and Killackey, 1978; Brecht, 2007). La información olfativa llega al *bulbo olfativo* de manera directa a través de los receptores olfatorios que se encuentran en el epitelio olfatorio de la nariz del animal. Las proyecciones del bulbo olfatorio inervan la corteza piriforme y entorrinal, entre otros. Se postula que la corteza piriforme al procesar la información olfativa maximiza la discriminación en la representación de distintos olores independientemente de que contengan componentes en común (Leinwand and Chalasani, 2011). La figura I.13ii ubica las estructuras mencionadas dentro del cerebro del ratón.

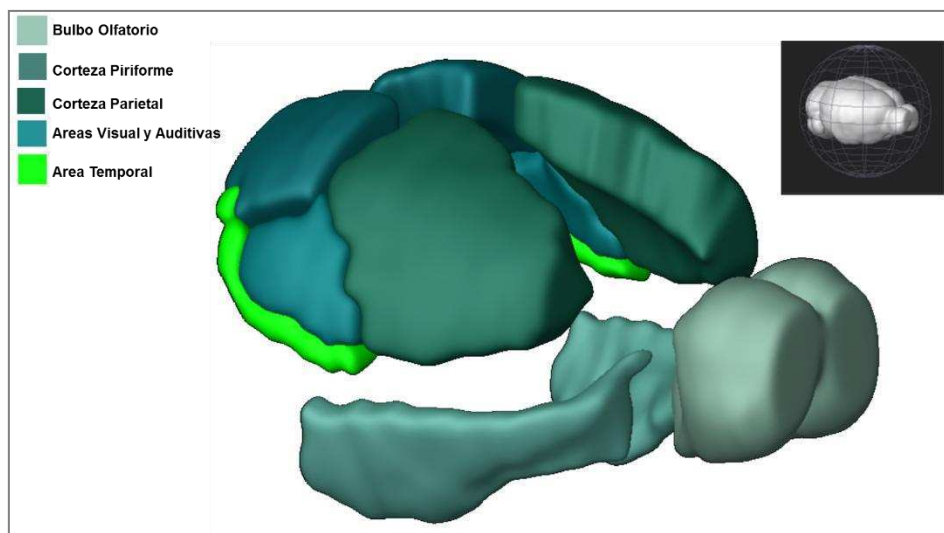


Figura I.13ii. Estructuras de la corteza sensorial involucradas en la MRO. Diseño realizado con el programa Brain Explorer® 2 del Allen Institute for Brain Sciences.

Corteza Perirrinal. Tal como se evidencia en la figura I.13i, en esta región de la corteza convergen las proyecciones de las zonas corticales especializadas en el procesamiento de diferentes estímulos sensoriales, por lo que es una región de asociación o procesamiento multi-modal. Esta estructura es, junto con el hipocampo, una de las más estudiadas en la memoria de reconocimiento en roedores. Los primeros estudios se realizaron lesionando esta estructura en ratas y evaluando la retención de la MRO a distintos tiempos luego del entrenamiento. Se encontró que los animales pueden discriminar un objeto novedoso de uno familiar hasta diez minutos luego del entrenamiento, pero no a tiempos mayores (Dere et al., 2007). La expresión de c-fos en esta región aumenta durante la consolidación de la MRO y la intervención farmacológica durante la consolidación de la MRO es amnésica (salvo algunas excepciones) (Brown et al., 2012; Zhu et al., 1995). Recientemente se ha encontrado que en esta región existen las denominadas “células-objeto” (*object cells* en inglés) que se activan cuando el animal se acerca al objeto. Es interesante destacar, que el porcentaje de neuronas activas y la tasa de disparo eran iguales así el objeto fuese novedoso o familiar, independientemente de que pasara más tiempo explorando al novedoso (Burke et al., 2012).

Hipocampo y subiculum. El *hipocampo*, denominado así por su similitud con el animal caballito de mar (hipo- viene del griego *hippo* que significa caballo y -campo viene de la palabra griega *kampos* que significa monstruo de mar), es una de las principales estructuras implicadas en memorias espaciales, contextuales y episódicas, tanto en humanos como en otros mamíferos (revisado en Opitz, 2014; Huijgen and Samson, 2015). El cerebro de humanos y otros mamíferos como el ratón, posee dos hipocampos, uno en cada hemisferio (figura I.13iv). El hipocampo, el subiculum y el giro dentado constituyen la formación hipocámpal (FH). El hipocampo a su vez se subdivide en tres regiones: CA1, CA2 y CA3 (figura I.13.iii). La información que llega a la FH fluye en la dirección giro dentado → CA3 → CA2 → CA1 → Subiculum, pero tal como se indica en la figura I.13i, algunas estructuras extrahipocámpales pueden conectarse directamente con las subregiones intermedias, por ejemplo CA1 o subiculum. En esta tesis nos referiremos al hipocampo o a la formación hipocámpal indistintamente.

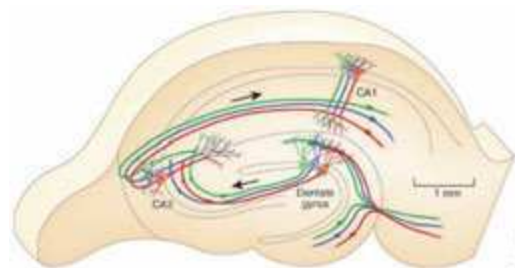


Figura I.13iii. Vista coronal de un hipocampo y el flujo de “información” entre las sub-regiones que lo componen.

Los primeros estudios que evidenciaron el rol del hipocampo en la MRO se realizaron lesionando el hipocampo antes o después de la exposición a objetos novedosos y observando la retención de la MRO un tiempo posterior. La mayoría de estos estudios indicaron que estas lesiones no afectan la formación, retención y/o evocación de la MRO, pero unos pocos mostraron que esta intervención sí tenía un efecto amnésico. Las discrepancias se atribuyeron a diferencias en el grado de la lesión del hipocampo. A continuación, se encontró que las lesiones en el hipocampo sólo afectaban el componente de recolección de la MRO y no el de familiaridad, sugiriendo así que el hipocampo procesaría información del “contexto” o del “objeto en contexto” y no del objeto en sí. En contrapartida, la evidencia proveniente de lesiones en la corteza perirrinial era robusta en cuanto a su efecto en la MRO, por lo que estas primeras observaciones sembraron la idea de que la estructura principal para el procesamiento de la MRO sería la corteza perirrinial mientras que el hipocampo sólo participaría en la construcción y/o almacenaje de la componente de recolección del proceso. Sin embargo los tratamientos con lesiones tienen varias desventajas, entre ellas i) el grado de la lesión es difícil de reproducir, ii) al ser una intervención permanente no es posible hacer una buena discriminación de la participación de estas estructuras en las distintas fases (adquisición-consolidación-evocación) de la MRO y iii) la lesión permanente puede inducir cambios plásticos en otras estructuras cerebrales conectadas con la que recibió la lesión y que alteren su procesamiento ordinario de manera tal de compensar los efectos de la lesión (Cohen and Stackman, 2015). El avance en la posibilidad de intervenir farmacológicamente y específicamente la zona del hipocampo fue clave para aportar nuevas evidencias y reevaluar esta concepción inicial. Una lista de los trabajos más importantes indicando los resultados de distintas intervenciones farmacológicas intra-hipocampales y su efecto en las fases de la MRO puede encontrarse en la revisión de Cohen y Stackman y en la de Dere Ekrem y colaboradores (Cohen and Stackman, 2015; Dere et al., 2007). En particular, se observó que los tratamientos farmacológicos luego del entrenamiento tienen efectos amnésicos sobre la MRO evaluada a las 24hs en casi todos los casos, indicando que esta estructura es clave para la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos de largo término. Si bien la evidencia a favor de que el hipocampo es necesario para la consolidación de la MRO es contundente, aún surgen numerosas discusiones respecto a cuáles son las componentes procesadas por la corteza perirrinial y cuáles por el hipocampo.

Por otro lado, se ha observado que la exploración de objetos modifica los campos de representación (*place fields* en inglés) de las neuronas hipocampales de las regiones CA1 y CA3 (Deshmukh and Knierim, 2013). Además, se encontraron neuronas que contendrían información acerca de la identidad de los objetos y su ubicación espacial y cuya actividad correlaciona con la performance en el reconocimiento de objetos (Manns and Eichenbaum, 2009).

Corteza Entorrinal. La corteza entorrinal es una estructura clave en la mediación entre la información sensorial procesada por estructuras neocorticales (las mencionadas al comienzo) y el hipocampo. En base a propiedades neuroanatómicas y electrofisiológicas, la corteza entorrinal (CE) se subdivide en la corteza entorrinal lateral (CEL) y la corteza entorrinal medial (CEM) (van Strien et al., 2009; Paxinos and Puelles, 2012). El primer estudio que vincula esta estructura con la exploración de objetos fue llevado a cabo por Zhu (Zhu et al., 1995). En él se observó que la expresión de c-fos se indujo luego de la exploración de objetos independientemente de si el objeto era novedoso o familiar. Un estudio posterior realizó un modelado computacional basado en el estudio de Zhu y otros, que predice que si el objeto es novedoso, la información fluiría de la CEL al giro dentado del hipocampo, mientras que si la información es familiar la información fluiría de la CEL a CA1 (Albasser et al., 2010). Ésta predicción es muy interesante, pero aún falta evidencia empírica que lo sustente. Por otro lado, del estudio de registros electrofisiológicos y lesiones durante o a continuación de la exploración de objetos, se construyó la concepción vigente de que la información espacial es procesada por la CEM y la información relacionada al objeto y/o al objeto en el contexto es procesada por la CEL (Eichenbaum et al., 2007). La CEM posee numerosos tipos de neuronas cuya actividad electrofisiológica se vincula con propiedades espaciales, tales como las *grid cells* (Hafting et al., 2005), *border cells* (Solstad et al., 2008), *head-direction cells* (Sargolini et al., 2006) y más recientemente las *speed cells* (Kropff et al., 2015), entre otras, y sus propiedades de disparo se ven poco moduladas por la presencia de los objetos. En cambio, en la CEL se han encontrado neuronas que disparan frente a la presencia de objetos (*object-cells*), neuronas que disparan en el lugar que se encontraba el objeto pero sólo luego de que éste haya sido removido (*object-trace cells*) (Tsao et al., 2013) y neuronas que disparan en zonas distales al objeto, pero sólo cuando el objeto está presente (Deshmukh and Knierim, 2011). En cuanto a los estudios con animales lesionados, se ha encontrado que lesionar la CEM trae déficits cognitivos en aquellas tareas que requieren del procesamiento de información espacial pero no del objeto, mientras que en el caso de la CEL el déficit es más ambiguo, indicando que esta estructura procesaría información tanto espacial como del objeto (Van Cauter et al., 2013). Son pocos los trabajos que estudian el rol de estas estructuras en las distintas fases de la memoria. El más relevante indica que, llamativamente, la lesión post-entrenamiento no introdujo déficits en la retención de la MRO (Kesner et al., 2001).

La idea general es que las estructuras corticales mencionadas recién (corteza perirrinal, entorrinal e hipocampo) participarían del almacenamiento de la MCT y la MLT, mientras que las estructuras de alto orden que mencionaremos a continuación participan de la consolidación sistémica y por ende se espera que tengan una participación en las primeras fases del *cross-talk* entre hipocampo y corteza y en el almacenamiento a largo termino (30 días). Cabe destacar, que estas estructuras no

sólo conectan recíprocamente con aquellas del lóbulo temporal medial, sino que también lo hacen con estructuras de la corteza sensorial, sirviendo así de plataforma para la plasticidad sináptica aún en las cortezas primarias, lo que permitiría, por ejemplo, inducir cambios permanentes en el comportamiento de un animal frente a un estímulo sensorial dado, y esto podría ser clave para garantizar su supervivencia.

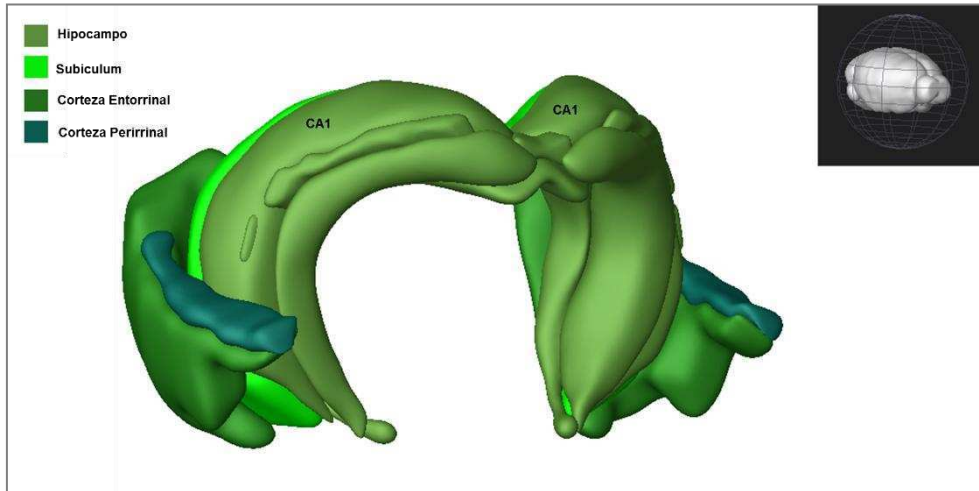


Figura 1.13iv. Estructuras de la corteza sensorial involucradas en la MRO. Diseño realizado con el programa Brain Explorer® 2 del Allen Institute for Brain Sciences.

Corteza Prelímbica e Infralímbica. La inyección de anisomicina, antagonistas de receptores glutamatérgicos y dopaminérgicos en la corteza pre- e infra-límbica después del entrenamiento trae déficits en la MLT pero no en la MCT de la MRO (Akirav and Maroun, 2006; Rossato et al., 2013).

Corteza Anterior Cingulada (CAC). Esta estructura es necesaria en eventos mnésicos que llevan a la formación de memorias remotas (Frankland et al., 2004; Teixeira et al., 2006; Ding et al., 2008). En cuanto a su rol en la formación y almacenamiento de la MRO, se ha observado que la expresión de c-fos en la CAC es mayor frente a un objeto novedoso que a uno familiar (Zhu et al., 1995), y que la actividad eléctrica de las neuronas en la CAC es fuertemente modulada por la presencia de objetos (Weible et al., 2012). En particular, presenta patrones de actividad muy interesantes, tales como la modulación de la actividad por el cambio de un objeto familiar por uno novedoso, y la activación de neuronas cuando el animal pasa por una región donde solía haber un objeto familiar (*absent-object cells*). La actividad de este último tipo de neuronas persiste hasta 30 días luego de la última presentación del objeto. Esta evidencia le adjudica a la CAC un rol único en la formación de memorias de reconocimiento de objetos remotas (Weible et al., 2012; Burke and Barnes, 2015).

Corteza Retrosplenial (CRS). Lesiones en la corteza retrosplenial no afectan la adquisición ni la MCT de la MRO (Parron and Save, 2004; Hindley et al., 2014). Se ha observado que las lesiones antes del entrenamiento no afectan la MLT reciente (1

semana) pero sí la remota (4 semanas), mientras que las lesiones 1 día post entrenamiento sí afectan la MLT reciente (Haijima and Ichitani, 2012). Estos resultados sugieren que probablemente durante la consolidación celular (dentro de las primeras 48hs) ésta estructura se encuentre participando de algún mecanismo de tipo *cross-talk* con el hipocampo, que al ser interrumpido, disrumpe la traza original, trayendo déficits en la performance, mientras que si la lesión se produce antes de la adquisición, este *cross-talk* no tiene lugar y la MLT reciente podría almacenarse de forma independiente a la CRS. En conjunto, los resultados aportan un dato interesante (y esperable): esta estructura es necesaria para la formación de memorias remotas. Registros electrofisiológicos indican que aproximadamente 10% de las neuronas de la CRS son *head-direction cells* que pueden ser moduladas por la actividad motora del animal por lo que esta estructura ha sido implicada en procesos de navegación espacial (revisado en Vann et al., 2009).

Núcleos talámicos y cuerpos mamilares. Estas estructuras reciben información de las regiones parahipocampales y de la FH a través del fórnix y proyectan a estructuras de la corteza prefrontal. Lesiones en los núcleos talámicos anterior, medio-dorsal, fórnix y cuerpos mamilares indican que estas estructuras son necesarias para tareas que involucran el procesamiento de información espacial, y producen déficits en ciertos tipos de memoria de reconocimiento (Aggleton et al., 1995; Mitchell and Dalrymple-Alford, 2005; Cross et al., 2012; Warburton and Brown, 2015).

Ganglios Basales. Los ganglios basales incluyen a las regiones estriadas, dentro de las que se encuentra el Núcleo Caudado (NC), entre otros, y la región pálida. Estos centros son claves para el control de funciones motoras, cognitivas y emotivas (Paxinos and Puelles, 2012). La estructura más estudiada en MRO es el núcleo caudado. Esta estructura es importante para el aprendizaje de tareas de tipo espacial. La inyección de antagonistas glutamatérgicos o la disrupción de la señalización dopaminérgica en NC afecta la adquisición y la consolidación pero no la MCT de reconocimiento de objetos (Sargolini et al., 2003; Nelson et al., 2010).

Estas estructuras se representan en la figura I.13v.

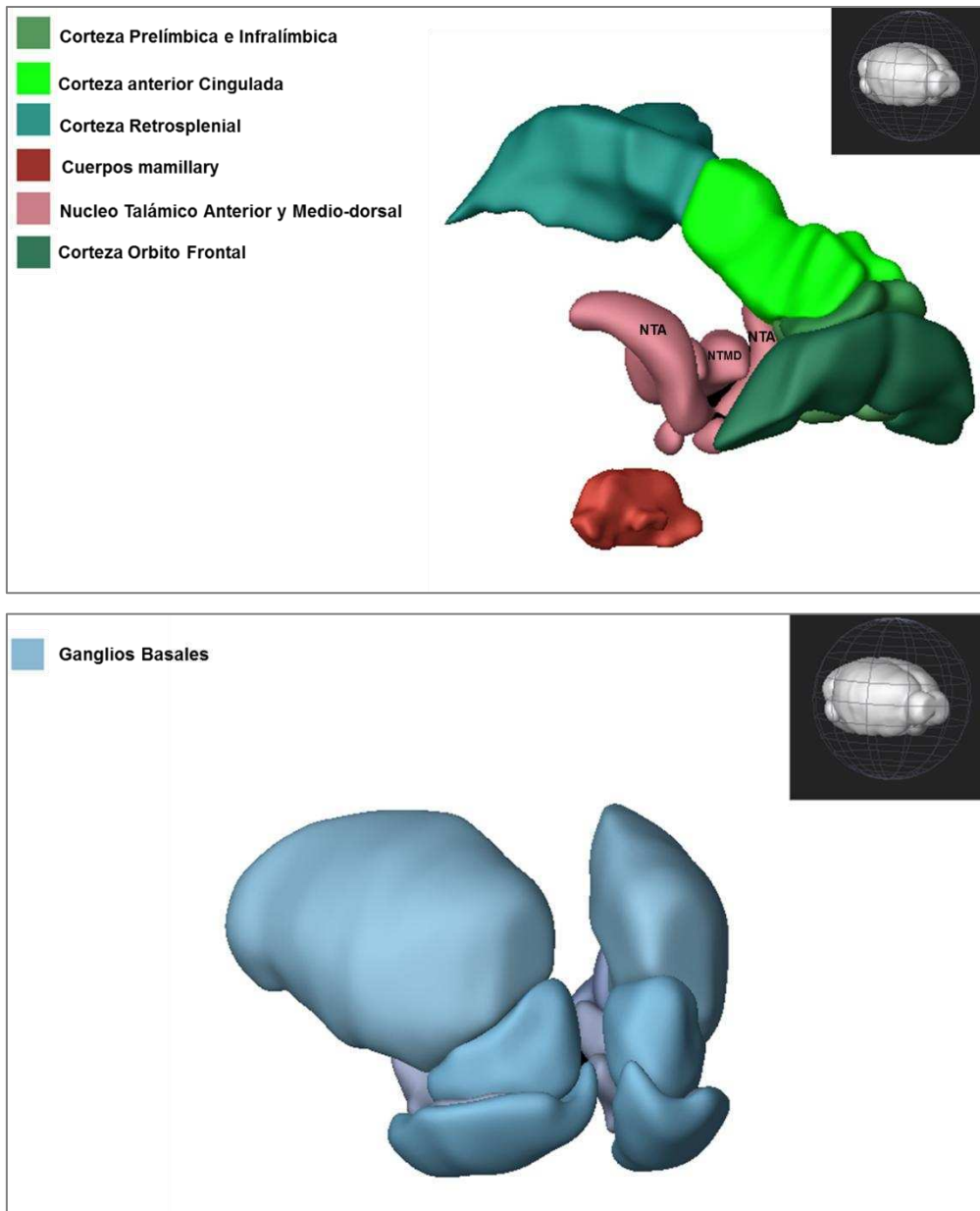


Figura 1.13v. Estructuras de la corteza sensorial involucradas en la MRO. Diseño realizado con el programa Brain Explorer® 2 del Allen Institute for Brain Sciences.

I.14 MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN LA CONSOLIDACIÓN DE LA MRO.

Los mecanismos moleculares subyacentes a la consolidación de la MRO son similares a los mencionados para los casos más generales. En particular, en el hipocampo, el paradigma NOR en roedores requiere de síntesis proteica inmediatamente luego del entrenamiento y a las 3hs, pero no 6hs luego (Rossato et al., 2007). Dentro de los FTs involucrados en la consolidación de la MRO en el hipocampo se encuentran CREB

(Pittenger et al., 2002; Bourtchouladze et al., 2003) y NF- κ B (Federman et al., 2013). Por otro lado, esta memoria es dependiente de la activación de receptores de glutamato del tipo N-metil D-aspartato (NMDA-R), tanto en hipocampo (Baker and Kim, 2002; Kemp and Manahan-Vaughan, 2004) como en corteza perirrinal (Winters and Bussey, 2005), receptores de cannabinoides (Maccarrone et al., 2002), transportador de GABA tipo 1 (Hu et al., 2004), cascadas de señalización tales como la vía mediada por AMP cíclico en distintas áreas del cerebro (Bozon et al., 2003) o en regiones más específicas como el hipocampo (Pineda et al., 2004), la vía de las quinasas activadas por mitógenos (MAPKs, por sus siglas en inglés, *mitogen activated protein kinase*) en hipocampo (Kelly et al., 2003), el cofactor con actividad de HAT, CBP, y la quinasa dependiente de Ca²⁺ y Calmodulina (CaMKII) (Miller et al., 2002). Además, se ha evidenciado que la consolidación de esta memoria puede ser modulada por estrés (Maroun and Akirav, 2008).

En cuanto a los mecanismos epigenéticos que afectan la MRO, se ha observado que la consolidación de la MRO depende de modificaciones post-traduccionales de histonas tales como acetilaciones (la acetilación favorece la consolidación de la MRO y lo contrario ocurre con las desacetilaciones) (Korzus et al., 2004; Stefanko et al., 2009). Recientemente, también se demostró que estas afectan la formación de MROs persistentes (Federman et al., 2013). Por otro lado, se observó que las proteínas remodeladoras BAF53b y el intercambio de histona H3.3 regulan positivamente la consolidación de la MRO (Vogel-Ciernia et al., 2013; Maze et al., 2015).

I.15 BDNF

Brain Derived Neurotrophic Factor o *BDNF* es una proteína secretora perteneciente a la familia de las neurotrofinas cuyo nombre traducido del inglés es *Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro*. Las neurotrofinas o factores neurotróficos son factores de crecimiento específicos del sistema nervioso que durante el desarrollo de las neuronas participan de los procesos de proliferación, diferenciación y supervivencia de las mismas. Estas neurotrofinas son dímeros de un péptido pequeño unido por puentes disulfuro entre residuo de cisteínas. Las neurotrofinas se empaquetan en vesículas que son liberadas al medio extra-celular como respuesta a diversos estímulos externos y una vez liberadas interactúan con receptores de membrana específicos para dar lugar a la cascada de señalización celular correspondiente (Nicholls, 2001). En particular, la actividad neuronal induce la liberación de BDNF, desde la pre- o post- sinápsis, y este puede unirse al receptor de membrana p75 o con mayor afinidad a TrkB que contiene en su interior un dominio tirosin-quinasa. Ambos receptores se encuentran en dendritas, axones y soma de neuronas excitatorias e inhibitorias. La unión de BDNF al receptor TrkB induce un cambio de conformación en el receptor que permite su

autofosforilación y a continuación la fosforilación de residuos de tirosina presentes en otras proteínas, lo que lleva a la activación de principalmente tres cascadas de señalización celular mediadas por la fosfolipasa C γ , la quinasa fosfatidilinositol-3, y la quinasa ERK1/2, respectivamente (revisado por Bekinschtein et al., 2014a).

BDNF regula los receptores iónicos de sodio, potasio, AMPA y NMDA, la expresión génica a nivel transcripcional (mediante la interacción con CREB y la activación de la cascada dependiente de ERK, entre otros) y traduccional (mediante la activación de mTOR y la cascada de ERK), incluso de manera local en sinápsis (Bekinschtein et al., 2007). Además induce cambios en la densidad y morfología de espinas y en neuronas piramidales inmaduras del hipocampo es utilizado como plataforma para dirigir el crecimiento axonal por quimiotaxis (Shen and Cowan, 2010; Huang et al., 2014). Hace ya 20 años de las primeras evidencias indicando que BDNF regula la función sináptica a corto término y la plasticidad sináptica dependiente de actividad neuronal de largo término, así como la transmisión sináptica en la pre- y post-sinápsis y la potenciación de largo termino (LTP) de las sinápsis (revisado por Poo, 2001).

I. 15.1 Expresión de BDNF en el hipocampo y rol en memoria.

El hipocampo, además de ser una estructura clave para el aprendizaje de diversos tipos de memoria, es la región neuroanatómica con mayor expresión de BDNF y su receptor TrkB en mamíferos (Murer et al., 2001). Una de las primeras evidencias mostrando un rol de BDNF en la consolidación de la memoria fue publicada por Ma en 1998. Aquí mostraron que las ratas con buenos niveles de retención de la memoria de miedo, adquirida durante el entrenamiento al paradigma de *evitación inhibitoria* (IA por sus siglas en inglés *Inhibitory Avoidance*), tenían aumentado los niveles de ARNm mensajero para BDNF en el giro dentado respecto a animales con poca retención. El aumento significativo entre grupos se observó 1h, 3h y 6hs post-entrenamiento pero no a los 30 min ni a las 24hs. Además se observó un efecto amnésico en la LTM medida a 24hs producido por la infusión de un oligonucleótido complementario al ARNm de BDNF (bloquea su expresión) durante la consolidación (Ma et al., 1998). Mas tarde, se encontró que el entrenamiento en IA aumenta el ARNm de BDNF en el hipocampo 1h post-entrenamiento pero no a las 4hs, 6hs ni 9hs y que la infusión de anticuerpo contra BDNF (de manera de bloquear su función) durante la consolidación de la memoria tiene efecto amnésico sobre la MLT (Alonso et al., 2002). Estos trabajos indican que la expresión y secreción de BDNF son necesarias para la consolidación de la MLT en el paradigma IA. Ratones *Knock-Out* (KO) para BDNF en el hipocampo presentan déficits en el aprendizaje de la tarea espacial del *Laberinto Acuático de Morris* y en la extinción de la memoria de miedo (Heldt et al., 2007). Por otro lado, recientemente se ha encontrado que la tarea de *Reconocimiento Espontáneo de Localización*, empleada para estudiar los mecanismos neurobiológicos por los cuales el

hipocampo realiza el proceso de separación de patrones o representaciones similares, requiere de la secreción y expresión de BDNF en el giro dentado específicamente cuando la exigencia en la tarea es elevada (reconocimientos o discriminación de representaciones espaciales similares) e induce un aumento en los niveles proteicos de BDNF en esta región a la hora post-entrenamiento (Bekinschtein et al., 2013). Un trabajo posterior a este sugiere que la consolidación dependiente de BDNF se daría por interacción entre esta neurotrofina y las neuronas inmaduras del giro dentado (Bekinschtein et al., 2014b). En conclusión, estos antecedentes indican que la consolidación de distintos tipos de memoria induce aumentos en la expresión de BDNF dentro de las primeras 3hs post-entrenamiento (aproximadamente) y que esta neurotrofina sería clave para el almacenamiento de la MLT.

I.15.2. Memoria de reconocimiento

En cuanto a su rol en la memoria de reconocimiento, ratones modificados genéticamente de manera tal de presentar una reducción significativa en los niveles de BDNF en el hipocampo presentan déficits en la formación de la MRO (Heldt et al., 2007). En ratas, la exploración de objetos induce la secreción de BDNF en el giro dentado (Callaghan and Kelly, 2012) y en CA1 (Furini et al., 2010). Por último, 2hs luego del entrenamiento, pero no inmediatamente ni 30 min luego, se induce un aumento en los niveles proteicos de BDNF en CA1 (Furini et al., 2010).

I.15.3 Regulación mediada por NF- κ B

El gen de BDNF es un gen de respuesta temprana que presenta 9 exones y 9 promotores que permiten obtener por lo menos 24 transcritos distintos como consecuencia del *splicing* alternativo de su gen (Cunha et al., 2010). Estos transcritos se traducen para dar lugar a la misma proteína madura (BDNF). Los promotores de su gen poseen numerosos sitios de unión a NF- κ B en su promotor y existen evidencias de que este gen se encuentra regulado por lo menos en parte, por NF- κ B (revisado por West et al., 2014; Kaltschmidt and Kaltschmidt, 2015). Se ha observado que NF- κ B se une al promotor del exón I y regula su expresión luego de la actividad neuronal (Lubin et al., 2008; Neidl et al., 2016). Además el gen de BDNF posee un sitio de unión a NF- κ B en el exón III, que es preferentemente transcrito por éste luego de la activación de receptores glutamatérgicos de tipo NMDA (Lipsky et al., 2001), y en astrocitos, la expresión proteica y de ARNm a través del exón IV es dependiente de NF- κ B (Saha et al., 2006). Por otro lado, la expresión selectiva a partir de estos exones se ha observado durante la consolidación de la memoria de miedo (Rattiner et al., 2004; Ou and Gean, 2007; Lubin et al., 2008). A pesar de que esta evidencia indica que NF- κ B tiene la capacidad de unirse al promotor de exones que han sido implicados en

procesos mnésicos, no existen evidencias de que NF- κ B regule la expresión de BDNF durante estos.

I.16 ZIF268

Zif268 (también conocido como Krox-24, NGF1-A, Egr1, TIS8, y Zenk) pertenece a la familia de las proteínas de *respuesta temprana al crecimiento*, (Egr en inglés, *early growth response*) que son FT inducibles que controlan la expresión de varios genes, y como tal, constituye un regulador maestro en el desarrollo y función celular. El gen zif268, es de respuesta temprana que se activa de manera rápida y transitoria. Éste gen se encuentra evolutivamente conservado y codifica para proteínas de 82 y 88 kDa que tienen la particularidad de poseer dominios de sitio de unión al ADN del tipo dedos de zinc (de ahí que se llama Zif, por *Zinc fingers* en inglés) (Veyrac et al., 2014). En los últimos años, ZIF268 ha demostrado ser clave en diversos procesos de plasticidad sináptica y memoria (Bozon et al., 2002; Soulé et al., 2008).

I.15.1 Expresión de ZIF268 en el SNC y genes target.

El gen y la proteína se expresan ubicuamente tanto en el sistema nervioso central (SNC) como periférico de organismos adultos. Las estructuras cerebrales con mayor expresión del gen son neocorteza, estructuras primarias olfativas, hipocampo, amígdala, estriado, tálamo y corteza cerebral.

El promotor de *zif268* posee dominios regulatorios del tipo SRE (del inglés *serum response element*), secuencias consenso para el FT AP1, sitios CRE y hasta un sitio que es reconocido por sí mismo, ya que ZIF268 puede unirse a este sitio y regular negativamente la transcripción de su propio gen (Veyrac et al., 2014). También posee secuencias consenso para NF- κ B. Un estudio reciente ha indicado que NF- κ B regula la transcripción de *zif268* luego de la muerte celular inducida por irradiación UV (Thyss et al., 2005). En otro trabajo se observó que la reconsolidación de la memoria de miedo condicionado induce la fosforilación y acetilación de histonas en torno al promotor de Zif268 y estos mecanismos epigenéticos dependerían de la vía de señalización de NF- κ B (Lubin and Sweatt, 2007). La regulación de ZIF268 por NF- κ B también ha sido observada en células humanas luego de la inducción de la respuesta inmune con lipopolisacáridos (Carayol et al., 2006).

No se conocen con claridad los genes que se encuentran río abajo de ZIF268 en procesos de plasticidad sináptica o memoria. En el SNC, estudios genómicos realizados a gran escala indican que la sobre-expresión de ZIF268 en células hipocampales que

fueron estimuladas con NMDA indujo cambios de expresión en 153 genes, la mayoría vinculados a la señalización celular, formación sináptica, respuesta inmune, proteasoma, y un número de FTs incluyendo a sí mismo. Sorprendentemente, todos, excepto tres de estos genes, fueron regulados negativamente, sugiriendo que ZIF268 es un represor de la transcripción (James et al., 2005).

I.15.1 Expresión y rol en memoria.

El entrenamiento en distintas tareas de aprendizaje y memoria llevan a un aumento en la expresión de ZIF268 en distintas estructuras que se encuentran en relación con la tarea en cuestión y en distintos modelos animales, desde primates no humanos hasta aves (revisado en Veyrac et al., 2014). En particular, se vio que en roedores el entrenamiento en el paradigma de condicionamiento de miedo contextual induce la expresión de ZIF268 en el hipocampo y amígdala (Maddox et al., 2011; Malkani and Rosen, 2000), mientras que el entrenamiento al paradigma NOR (Soulé et al., 2008) y tareas de navegación espacial inducen su expresión en el hipocampo (Guzowski et al., 2001). La expresión de ZIF268 durante la consolidación de este tipo de memorias aumenta aproximadamente 30 min luego del entrenamiento y retorna a los niveles basales al cabo de 2hs. Su patrón de expresión rápido y transitorio ha fomentado su uso como marcador inmunohistoquímico de neuronas recientemente activas (Kubik et al., 2007) para así mapear los circuitos activados como consecuencia de la experiencia comportamental. Recientemente además se ha visto que su expresión aumenta, una vez más de manera transitoria, durante procesos de persistencia de la memoria (sección I.8.1, Katche et al., 2012a). A pesar de que aparentemente ZIF268 regularía negativamente la transcripción de la mayoría de los genes que se encuentran río abajo del mismo, es evidente de los resultados mencionados anteriormente, que los programas de expresión génica reclutados por este FT permitirían estabilizar la memoria.

Los estudios funcionales de ZIF268 en tareas de aprendizaje y memoria indican que este FT participa de mecanismos moleculares claves en la consolidación de la MLT. (revisado en Besnard et al., 2014; Veyrac et al., 2014). Unos años atrás se desarrollaron unos ratones KO para Zif268 que presentaban una MCT intacta para diversas tareas comportamentales, sin embargo se encontraron déficits en la MLT para diversas tareas como, condicionamiento aversivo gustativo, transmisión social de preferencia alimentaria, localización objeto-lugar y condicionamiento de miedo contextual (Bozon et al., 2002). La inhibición de su expresión mediante la administración de oligonucleótidos ha demostrado su participación durante la reconsolidación y mantenimiento de la memoria (Lee et al., 2004; Katche et al., 2012a).

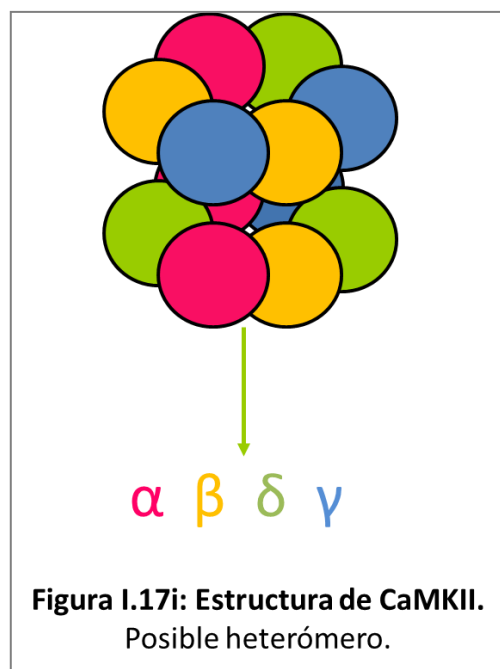
I.17 CAMKII δ

I.17.1 CaMKII

La protein-kinasa dependiente de Calcio/Calmodulina o CaMKII por sus siglas en inglés *Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II* es una de las principales enzimas efectoras involucradas en la vía de señalización de Calcio en células eucariotas. La enzima se activa como consecuencia del aumento del calcio intracelular y fosforila proteínas target involucradas en diversas funciones tales como plasticidad sináptica, movilización de vesículas sinápticas, regulación de la expresión génica, regulación de la contracción muscular y modulación de canales iónicos (Gaertner et al., 2004).

Estructura

CaMKII es una holoenzima compuesta por aproximadamente 12 subunidades que se ensamblan formando 2 anillos de 6 subunidades cada una (Lucchesi et al., 2011). Estas subunidades son proteínas codificadas por cuatro genes distintos pero altamente relacionados: *camk2 α* , *camk2 β* , *camk2 δ* y *camk2 γ* . La figura I.17i muestra la estructura de la enzima empleando como ejemplo la asociación de las isoformas para generar un heterododecámero. En la realidad, la composición puede estar enriquecida en alguna de las isoformas, o bien puede componerse exclusivamente de una (homododecámero).



Los ARNms de genes que codifican para las distintas isoformas pueden sufrir splicing alternativo, dando lugar a la síntesis de aproximadamente 30 isoformas distintas. La estructura proteica se encuentra conservada entre las distintas isoformas: poseen un *dominio catalítico* amino terminal, seguido de un *dominio regulatorio* que contiene una región auto-inhibitoria y un sitio de unión para el complejo Ca²⁺/Calmodulina (Ca/CaM), un *dominio de secuencia variable* y por ultimo un *dominio asociativo* (o de oligomerización) en el extremo carboxi-terminal que permite el ensamblaje entre las distintas subunidades (Colbran and Soderling, 1990; Schulman et al., 1992). La homología en las secuencia peptídicas de las distintas isoformas y variantes de splicing es del 82-87%, y la principal diferencia se encuentra en la secuencia dentro del *dominio variable* (Gaertner et al., 2004).

La enzima se expresa principalmente en el cerebro, aunque también lo hace en el resto de los tejidos. En algunas regiones del cerebro, como el hipocampo, que es una estructura clave para la formación de ciertos tipos de MLT, su niveles proteicos alcanzan hasta el 2% de los niveles totales (Ataei et al., 2015). Las isoformas que sólo se expresan en el cerebro son la α y β , mientras que la γ y la δ se expresan de manera ubicua (Bennett et al., 1983; Tobimatsu and Fujisawa, 1989; Lucchesi et al., 2011).

Isoformas

La información obtenida a partir del estudio de cada una de las isoformas permitió demarcar diferencias y similitudes en su afinidad por calcio, su localización y su función. Por ejemplo, en el trabajo de Gaertner y colaboradores, muestran que la afinidad por calmodulina y la tasa de autofosforilación entre las distintas isoformas es $\gamma > \delta > \beta > \alpha$ y $\delta > \beta > \alpha > \gamma$, respectivamente (Gaertner et al., 2004).

Todas las isoformas se expresan en el cerebro, en particular en las capas piramidales y el giro dentado del hipocampo (Murray et al., 2003). La isoforma CaMKII α es una proteína citosólica que localiza en dendritas y es una de las principales proteínas en la densidad post-sináptica (PSD por sus siglas en ingles, *post-synaptic density*). Su localización en la PSD es exclusiva de sinapsis excitatorias y se daría en parte gracias a la asociación con la isoforma β (Liu and Jones, 1997; Shen et al., 1998; Shen and Meyer, 1999). Además tiene la particularidad de que su ARNm trasloca a dendritas, donde se traduce de manera local (Mayford et al., 1996; Mori et al., 2000; Murray et al., 2003). También se expresa en pre-sinapsis (Liu and Murray, 2012). Estas características hacen que sea la isoforma más estudiada en el ámbito de la neurobiología de la memoria y ha demostrado ser necesaria para la formación de MLT en diversos paradigmas comportamentales (Lucchesi et al., 2011; Giese and Mizuno, 2013; Ataei et al., 2015).

La isoforma CaMKII β posee un dominio de unión a F-actina y en estado basal se encuentra unida a esta. La activación de los receptores de NMDA induce su desprendimiento de F-actina y su translocación hacia la densidad post-sináptica junto con la isoforma CaMKII α , con la que suele asociarse para formar la heteroenzima α/β -CaMKII (Shen and Meyer, 1999).

La isoforma CaMKII γ se expresa en el cerebro de mamíferos, en tejido cardíaco, en músculo liso, hígado y células del sistema inmune (Tobimatsu and Fujisawa, 1989; Bayer et al., 1999; Gangopadhyay et al., 2003). En neuronas, recientemente se demostró que la despolarización induce la translocación de esta isoforma al núcleo y postularon que su principal función es servir como proteína transportadora del complejo Ca/CaM al núcleo de manera tal de inducir la cascada de señalización

dependiente de este y del conjunto de familias CaMK y que da lugar a la regulación transcripcional mediada en parte por CREB (Ma et al., 2014). Los pocos antecedentes que se encuentran respecto a su vínculo con funciones cognitivas son en humanos e indican que la variabilidad genética en torno a este gen afecta la performance en tests de memoria episódica (de Quervain and Papassotiropoulos, 2006) y la capacidad intelectual (de Ligt et al., 2012).

CaMKII δ

Tal como se mencionó anteriormente, la isoforma CaMKII δ se expresa de manera ubicua, sin embargo, en células del corazón es la isoforma predominante, y está vinculada a desordenes cardíacos por lo que la mayoría de los trabajos realizados con esta proteína se basan en resultados obtenidos a partir de cardiomiocitos o afín (Gray and Heller Brown, 2014).

Se identificaron 11 variantes provenientes de splicing alternativo del gen que se expresan de manera diferencial en el cerebro, en el corazón y en musculo esquelético (Gray and Heller Brown, 2014). La nomenclatura empleada para designar las distintas variantes es inconsistente entre los trabajos publicados lo que dificulta distinguir cuales son las variantes expresadas en uno y otro tejido, pero en general se observa que al menos tres variantes distintas se expresan en el cerebro de rata y que otras tres variantes se expresan en tejido de musculo cardíaco una de las cuales posee una secuencia de localización nuclear que permite su translocación al núcleo (Schworer et al., 1993; Mayer et al., 1994, 1995).

Mecanismo de Activación

El ingreso de calcio a la célula lleva a la formación del complejo Calcio/Calmodulina (Ca²⁺/CaM), que une aproximadamente 3-4 iones calcio por calmodulina en forma cooperativa (Hanson et al., 1994). Este complejo se une a CaMKII y le produce un cambio conformacional que induce su actividad enzimática. La activación mediada por el complejo Ca²⁺/CaM lleva no solo a la fosforilación de sus sustratos, sino también a su autofosforilación. El proceso de autofosforilación avanza de manera paulatina. En una primera instancia, la auto-fosforilación disminuye la tasa de disociación de la calmodulina unida lo que permite que esta se siga autofosforilando aún si los niveles de calcio intracelulares disminuyen. Alcanzado un grado de autofosforilación crítico, la actividad enzimática se torna independiente de la unión de calmodulina y se dice que la enzima adquiere actividad autónoma (aunque su capacidad enzimática es menor a cuando hay calcio en la célula y por ende complejo unido) (Hanson et al., 1989, 1994).

Esta enzima presenta dos características que hicieron que sea una de las principales candidatas como mediadora de la respuesta celular luego del ingreso de pulsos de

calcio: i) Su capacidad para detectar pequeñas variaciones en la concentración del calcio intracelular; ii) La particularidad de esta enzima de mantener su actividad enzimática aún luego de que el calcio intracelular retorna a su concentración basal. Dado que los potenciales de acción involucran pulsos repetidos de calcio y que esta enzima es predominante cerebral, cobró mucha relevancia en su estudio en mecanismos de memoria y plasticidad sináptica (Hanson et al., 1994; Coultrap and Bayer, 2012; Hell, 2014).

CaMKII y memoria

La activación del receptor de NMDA a continuación de una experiencia comportamental es un proceso clave para la formación de la MLT (Gruart et al., 2006). Esta activación permite el ingreso de calcio a la neurona el cual se une a calmodulina para formar el complejo Ca/CaM que es reconocido por múltiples enzimas induciendo así una cascada de señalización molecular que tiene como principal objetivo remodelar la estructura sináptica y regular la expresión génica necesarias para la formación de la MLT (Giese and Mizuno, 2013). Uno de los principales target de Ca/CaM es CaMKII (Ataei et al., 2015). En línea con esto, la actividad de CaMKII aumenta durante la formación de MLT (Cammarota et al., 1998) y su inhibición tiene un efecto negativo sobre esta (Lisman et al., 2002; Elgersma et al., 2004; Irvine et al., 2006; Wayman et al., 2008; Lucchesi et al., 2011; Coultrap and Bayer, 2012). CaMKII se une a numerosas proteínas en la PSD, entre ellas NMDA, sinapina 1, F-actina y canales de calcio. Presumiblemente esta unión sirve para regular su actividad autónoma, su localización y/o transportar otras proteínas a regiones de interés (Lucchesi et al., 2011). CaMKII también regula el número de receptores AMPA y su conductancia y promueve el rápido crecimiento de filopodia dendríticas y formación de espinas dendríticas (Lucchesi et al., 2011; Giese and Mizuno, 2013; Ataei et al., 2015).

En cuanto al rol individual de cada una de las isoformas en procesos cognitivos, la mayoría de los estudios se centraron en la isoforma α y β . El desarrollo de ratones KO para estas isoformas permitió determinar que ambas son necesarias para la formación de MLT y el remodelamiento de la post-sinapsis (Giese and Mizuno, 2013; Lucchesi et al., 2011). La información del rol de las isoformas γ y δ en procesos cognitivos es escasa. Los únicos antecedentes que se conocen para la isoforma γ es en humanos, en donde proponen que esta proteína participaría de la formación de memoria episódica (de Quervain and Papassotiropoulos, 2006; de Ligt et al., 2012). En cuanto a la isoforma δ , un estudio del perfil de expresión génica luego de el entrenamiento al condicionamiento de miedo aversivo indujo la expresión del gen *camk2d* a tiempos comparables a los genes de respuesta tardía (Sirri et al., 2010). En un trabajo reciente de nuestro laboratorio se observó que el entrenamiento en la tarea de NOR induce la

acetilación y unión de NF- κ B al promotor del gen y un aumento en su expresión 3hs después del entrenamiento (Federman et al., 2013).

II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

El **objetivo general** de esta tesis es estudiar la regulación y expresión de genes que, por tener secuencias consenso para NF- κ B en su promotor y estar de algún modo vinculados a procesos mnésicos, se proponen como candidatos a ser regulados por NF- κ B durante la consolidación de la memoria de largo termino (MLT).

Los **objetivos particulares** son:

- > Estudiar si NF- κ B regula la expresión de los genes de respuesta temprana BDNF y ZIF268, y el gen de respuesta tardía, CaMKII δ , durante la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos en el hipocampo de ratón.
- > Estudiar la expresión y el rol de los productos codificados por estos genes en procesos que afectan la formación de la memoria de reconocimiento de largo término en el hipocampo de ratón. En el caso de CaMKII δ , también se estudiara su expresión y rol en el mantenimiento de la memoria de reconocimiento de objetos de largo término.
- > Estudiar cambios epigenéticos en el promotor de CaMKII δ de neuronas del hipocampo, inducidos por el entrenamiento al paradigma NOR.

Las **hipótesis** son:

1. El entrenamiento al paradigma NOR induce la expresión proteica de los genes de respuesta inmediata BDNF y Zif268 y NF- κ B regula este proceso.
2. NF- κ B regula la expresión del gen de respuesta tardía CaMKII δ .
3. BDNF y ZIF268, al ser codificados por genes de respuesta inmediata, participan de procesos que afectan la formación de la MLT mientras que CaMKII δ , que es codificado por un gen de respuesta tardía, participa de procesos que afectan componentes vinculadas a la persistencia de esta MLT en el tiempo.
4. La formación y mantenimiento de memorias persistentes viene acompañado de cambios en el posicionamiento nucleosomal en sitios claves para la regulación de la expresión génica.

El modelo animal elegido es el ratón de la especie *mus musculus*. Este modelo presenta características que facilitan su manipulación e intervención

farmacológica. Además es uno de los modelos más estudiados en el área de las neurociencias, ya que se cuenta con un amplio conocimiento de su comportamiento y genética y se dispone de herramientas para el estudio de los mecanismos moleculares que tienen lugar durante distintos procesos mnésicos.

El paradigma comportamental empleado es el de *Reconocimiento de Objetos Novedosos*. En trabajos previos de nuestro laboratorio se han caracterizado, en esta tarea, los entrenamientos que permiten inducir memorias de largo término de distinta fuerza y persistencia (Federman et al., 2013).

III. METODOLOGÍA

III.1 SUJETOS EXPERIMENTALES

Para el estudio del rol de NF- κ B en la regulación de BDNF y Zif268 (sección IV.I) se utilizaron ratones *Mus Musculus* de la cepa CF1, machos, de entre 6 y 8 semanas de edad y de un peso aproximado de 30 a 35 gramos. Los ratones fueron provistos por el bioterio de la *Facultad de Ciencias Veterinarias* perteneciente a la Universidad de Buenos Aires (FVET-UBA) en Buenos Aires, Argentina.

Para el estudio de la participación de CaMKII δ en la formación y mantenimiento de memorias persistentes (sección IV.II) se emplearon ratones *Mus Musculus* de la cepa C57BL/6, machos, de entre 6 y 8 semanas de edad y de un peso aproximado de 30 a 35 gramos provistos por los bioterios de la *Facultad de Ciencias Veterinarias* y la *Facultad de Ciencias Exactas y Naturales* de la Universidad de Buenos Aires (FVET-UBA y FCEN-UBA, respectivamente), la *Facultad de Ciencias Veterinarias* de la Universidad Nacional de La Plata (FVET-UNLP) y por último el bioterio de la *Comisión Nacional de Energía Atómica del Centro Atómico de Ezeiza* (CNEA-CAE).



Figura III.1.1. *Sujetos experimentales. A la izquierda se muestra un ratón de la cepa CF1 y a la derecha un ratón de la cepa C57BL/6, empleados en los experimentos de las partes I y II de la sección Resultados, respectivamente.*

Los animales fueron alojados en un *cuarto de alojamiento*, dentro de cajas translúcidas que contenían un “colchón” de viruta en su interior. Se agruparon de 2 a 5 individuos por caja, con excepción de los animales quirúrgicamente canulados que fueron alojados en forma individual. El agua y la comida fueron provistos *ad libitum*. Dentro del cuarto de alojamiento se mantuvo un ciclo de luz/oscuridad de 12hs; las luces se prendían de 8 a 20hs y se mantenían apagadas de 20 a 8hs. Los experimentos propiamente dichos se llevaron a cabo en un *cuarto de experimentación*, vecino al

cuarto de alojamiento y fueron realizados durante el ciclo de luz de los animales. Ambos cuartos se mantuvieron a una temperatura de entre 21 y 23°C.

Aspectos Éticos

Los experimentos fueron realizados en concordancia con las regulaciones locales y la “Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio” publicado por el Instituto Nacional de la Salud (en inglés, *National Institute of Health – NIH-*) de Estados Unidos (NIH publication 80-23/96). Los procedimientos experimentales que se detallan a continuación cuentan con la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL, número de aprobación del protocolo: #29) perteneciente a la Universidad de Buenos Aires.

III.2 PROTOCOLO NOR

III.2A Dispositivo de entrenamiento y evaluación.

El entrenamiento y la evaluación se llevaron a cabo en una arena experimental dentro de la cual se colocó viruta, de igual característica a aquella empleada en las cajas de alojamiento, y los objetos según correspondiera.

En la sección IV.I la arena experimental empleada consistió en una caja rectangular (30 x 21.5 cm) de PVC rígido espumado de 23 centímetros de alto, mientras que para la Sección IV.II se empleó una arena experimental similar pero con paredes de 30 cm (7 cm más altas). El piso de la caja se cubrió con viruta, pero debajo de esta se colocaron dos cintas de velcro adheridas al piso que se utilizaron para ubicar y fijar los objetos que poseen adherida en su base la cinta de velcro complementaria. En los experimentos de la sección IV.I para evitar que los animales salieran de la caja, la parte superior se tapó con dos tapas de acrílico transparente, cada una cubriendo aproximadamente la mitad de la caja. Estas tapas se distinguen porque una se encuentra fijada a la caja con cinta de papel en los bordes mientras que la otra puede abrirse y cerrarse para permitir colocar y retirar los animales de la caja. Las tapas de acrílico se colocaron de manera tal de dejar dos ranuras abiertas para permitir la circulación de aire. Los experimentos de la sección IV.II se llevaron a cabo en cajas con paredes más altas por lo que no fue necesario emplear las tapas.

Los objetos empleados fueron un par de bloques azules de juguete marca “Rasti” y un par de vasos de precipitados de 50ml, ambos objetos de tamaño similar, y fueron ubicados dentro de la arena experimental tal como se muestra en la figura III.2i. Estos objetos no tienen ninguna significancia natural para el animal ni están asociados a

refuerzo positivo (Hammond et al., 2004). Tanto en la sesión de entrenamiento como en la de evaluación los objetos fueron limpiados con un papel embebido en alcohol 96° (marca Sanicol) justo antes de colocar al animal en la arena experimental, para evitar que queden claves olfativas en los objetos.

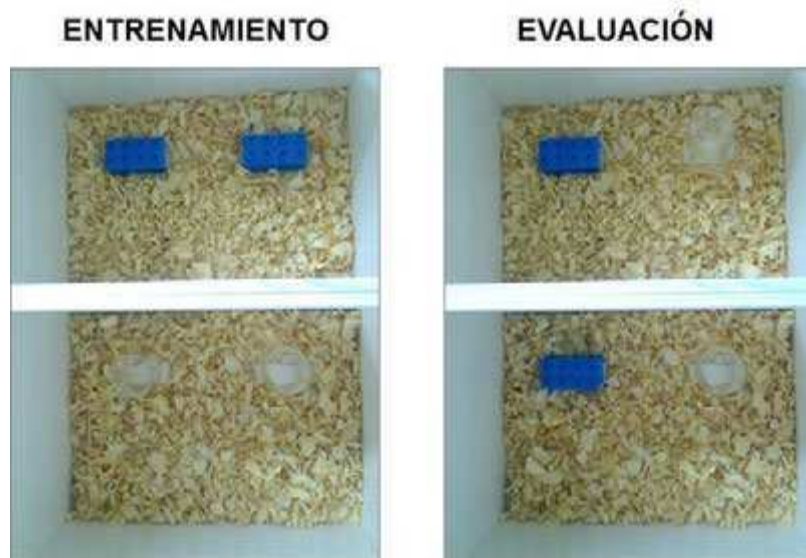


Figura III.2i. Las cajas utilizadas para el paradigma de reconocimiento de objeto novedoso, conteniendo los objetos. A la izquierda, se observan las cajas con la disposición de los objetos en el entrenamiento. A la derecha, las cajas con los objetos en la disposición para realizar la sesión de evaluación.

Las sesiones de entrenamiento y evaluación fueron filmadas para luego cuantificar el tiempo de exploración de los objetos para cada animal. Para ello se empleó una cámara web (marca *Logitech*, modelo *Tessar 2.0/3.7 2MP autofocus*) ubicada 30cm por encima de la arena experimental y conectada a una PC de escritorio. Las grabaciones se ejecutaron a través de la computadora, usando el programa *Logitech Quicktime®*.

III.2B Protocolo Comportamental

El protocolo del paradigma de Reconocimiento de Objeto Novedoso o NOR por sus siglas en inglés, *Novel Object Recognition*, se basó en el publicado por Noel Federman y colaboradores (Federman et al., 2013). El mismo consiste en cuatro sesiones que se llevan a cabo a lo largo de 7 días consecutivos en todos los casos, excepto en el intervalo temporal entre el entrenamiento y la evaluación que varía según el experimento en cuestión (ver figura III.2ii). Todas las sesiones se desarrollaron en el *cuarto de experimentación* y dentro de la misma franja horaria para evitar efectos circadianos sobre la evaluación mnésica.

Día 1 y 2: Sesión de Manipulación o “Handling” (Hdl).

El animal se coloca en la palma de una mano y luego se lo pasa de una mano a otra durante 2-3 minutos de manera tal que el animal toma contacto con el experimentador, se familiariza con éste y, de esta manera, se disminuye su nivel de estrés al momento de la manipulación del mismo durante las sesiones de entrenamiento y evaluación. La sesión se lleva a cabo una vez al día durante dos días consecutivos.

Día 3-5: Sesión de Habitación (HAB).

El animal se coloca en la arena experimental sin objetos durante cinco minutos. La Habitación se realiza una vez al día durante tres días y al igual que la sesión de Handling, tiene como objetivo disminuir el nivel de estrés del animal a un contexto novedoso de manera que este no interfiera con la consolidación de la memoria de los objetos al momento del entrenamiento (Okuda et al., 2004). Además, durante la sesión de habitación el animal aprende información espacial del contexto (la arena experimental y su entorno) y de esta manera este aprendizaje queda temporalmente separado del aprendizaje de los objetos que tiene lugar durante las sesiones de entrenamiento y evaluación.

Día 6: Sesión de Entrenamiento (TR).

Se coloca al ratón en la arena experimental conteniendo dos objetos idénticos (figura III.2i, imagen a la izquierda) y se los deja explorar durante un tiempo fijo. Pasado este tiempo, el animal es retirado de la arena y devuelto a su caja de alojamiento. Luego se coloca otro animal en la arena experimental y se repite el proceso. En cada experimento se procuró que aproximadamente la mitad de los animales fueran entrenados con los bloques azules y la otra mitad con los vasos de precipitados, para que el experimento fuera balanceado y se descartará cualquier tipo de efecto por preferencia de alguno de los objetos o su localización (Hale and Good, 2005). Además, en caso de que hubiera alguna diferencia entre las cajas experimentales, se procuró no emplear siempre el mismo par de objetos en la misma caja, sino ir alternando entre tanda y tanda.

Los tiempos de entrenamiento fueron **10 minutos** (entrenamiento estándar, "TR") o **15 minutos** (entrenamiento fuerte, "fTR"), según el experimento. La elección de estos tiempos se basó en los resultados previos publicados en Federman et al., 2013, en el que demuestra que ambos protocolos inducen la formación de una memoria de largo término, pero que en el caso de los animales que son entrenados durante 15 minutos, la memoria formada es más "fuerte" ya que persiste por más tiempo. En algunos experimentos se incluyó un grupo de animales control que durante esta sesión fueron colocados en la arena en ausencia de objetos. Este grupo se denomina "No-TR" y es un grupo no entrenado que en su lugar recibe una sesión de habitación extra y

extendida a 15 minutos. Este control nos permite distinguir entre los cambios moleculares y comportamentales producto de la exploración y reconocimiento de objetos novedosos y aquellos que surgen como consecuencia de la exploración y reconocimiento del contexto.

Día 7: Sesión de Evaluación o Testeo (TS).

Esta sesión tiene lugar 1, 7 o 20 días luego de la sesión de entrenamiento, según el experimento. El animal es colocado durante cinco minutos en la arena experimental que contiene un bloque azul y un vaso de precipitado (figura III.2i, imagen de la derecha). Uno de estos objetos es idéntico al explorado durante la sesión de entrenamiento y se lo denomina *Objeto Familiar*, el otro es un objeto distinto y desconocido por el animal y se lo denomina *Objeto Novedoso*; por ejemplo, si el entrenamiento se llevó a cabo con el par de bloques azules, en la sesión de evaluación, el objeto familiar será el bloque azul y el novedoso, será el vaso de precipitado. La ubicación de los objetos dentro de la caja es la misma tanto en la sesión de entrenamiento como en la de testeo. La localización del objeto novedoso fue intercambiada entre izquierda y derecha entre distintos animales, de manera tal de evitar preferencias de lugar durante la sesión de evaluación.



Figura III.2ii. Esquema del protocolo comportamental empleado. En los recuadros de TR y TS los rectángulos y cuadrados indican la simbología que se empleará en la sección de resultados para denotar los distintos tipos de entrenamiento y la sesión de testeo.

Observaciones

- ! Para evitar la coerción en la exploración de los objetos, el animal es introducido a la arena experimental mirando al centro de la pared opuesta a aquella vecina a los objetos de manera que al inicio de la sesión de entrenamiento se encuentra equidistante y de espaldas a ambos objetos (Antunes and Biala,

2012). Esta forma de introducirlos se respeta durante la sesión de habituación y evaluación.

- ! La viruta del piso de la arena experimental es re-acomodada entre animal y animal de manera que cada vez que son introducidos a la arena la viruta sea homogénea en todo el piso y no hayan marcas visuales distintivas.
- ! Se corroboró que los objetos usados en estos experimentos presentan la misma tendencia d exploración espontánea, es decir que no hay una preferencia de uno sobre el otro (ver IV.1.1 y Federman et al., 2013).

III.2C Análisis de Datos

Para cada animal se analizó el *tiempo de exploración* de cada uno de los objetos a partir de los videos grabados durante las sesiones de entrenamiento y evaluación. Se estableció como *exploración* del objeto a la acción de orientar la cabeza hacia el objeto a una distancia no mayor a 2 cm o cuando su nariz toca el objeto. La acción de subir, bajar o empujar un objeto no fue considerada una acción de exploración (Hammond et al., 2004; Antunes and Biala, 2012; Federman et al., 2013). Para el registro temporal de exploración en la primer parte de resultados de la Tesis (experimentos con CF1) se emplearon dos cronómetros idénticos marca *Tressa*, cada uno sirvió para cuantificar la exploración de uno de los objetos en forma manual. Para la segunda parte se emplearon los cronómetros para PC *xNoteTimer* (versión 1.11).

Durante la *sesión de entrenamiento* se calculó para cada animal el tiempo total de exploración (la suma del tiempo de exploración de cada objeto) y se comparó este valor con el tiempo promedio de exploración del grupo ya que es necesario que todos los animales a ser considerados *a posteriori* tengan un comportamiento exploratorio similar al momento de la adquisición. Aquellos animales cuyos niveles de exploración se encontraban por debajo de dos desvíos estándar del promedio no fueron considerados para el posterior análisis. Aproximadamente 1% de los animales entrenados presentaron bajos niveles de exploración en el entrenamiento y este caso se dio casi exclusivamente en animales canulados independientemente del grupo experimental al que habían sido asignados.

Durante la *sesión de evaluación* para cada animal se determinó el tiempo de exploración de cada objeto, y se calculó el tiempo relativo de exploración de cada objeto, expresado mediante un Índice de Discriminación, ID%:

$$ID\% = \frac{(t_{novedoso} - t_{familiar})}{(t_{novedoso} + t_{familiar})} \times 100$$

Donde $t_{novedoso}$ es el tiempo de exploración del objeto novedoso y $t_{familiar}$ es el tiempo de exploración del objeto familiar, ambos expresados en segundos.

Finalmente se calculó el ID% promedio para cada grupo experimental. Para determinar diferencias significativas en la memoria de largo término se realizaron las comparaciones estadísticas correspondientes entre los ID% promedio de los grupos provenientes de los distintos tratamientos. Por otro lado, se evaluó que el tiempo de exploración de cada sujeto no se alejara más de dos desvíos estándar de la media para su grupo y en los casos de animales que recibieron infusiones intrahipocampales, se comparó el tiempo total de exploración promedio entre grupos inyectados con distintas drogas para verificar que ésta no afectara la movilidad y motivación de los animales para explorar objetos. Por otro lado, se corroboró que no hubieran preferencias por uno u otro de los objetos usados y por los lados izquierdo o derecho de la caja. Para ello, se calculó el ID_R (índice de discriminación del rasti) e ID_{izq} (índice de discriminación del lado izquierdo) durante la sesión de testeo en animales no entrenados (No-TR) (secciones IV.I.1 y IV.II.2).

III.3 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical a distintos tiempos luego del entrenamiento y rápidamente se les removió el cerebro y se realizó una disección para aislar los hipocampos según el método descrito por Glowinski e Iversen (Glowinski and Iversen, 1966). Luego de la disección los hipocampos se homogeneizaron en un homogeneizador dounce "Tight", agregando 250ul de Buffer A (10 mM HEPES pH 7.9, 1.5 mM $MgCl_2$, 10mM KCl, 1mM DDT, 0.5 ng/ml pepstatina A, 10 ng/ml leupeptian, 0.5 mM PMSF, and 50 ng/ml aprotinina) y bajando el émbolo 7 veces. El homogenato resultante se centrifugó durante 15 minutos a 1000 g. El sobrenadante contiene la fracción citosólica, la cual se transfirió a otro tubo eppendorf y se almacenó a $-80^\circ C$. El precipitado se resuspendió completamente en 30ul de Buffer B (20 mM Hepes pH 7.9, 1.2 M KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.4 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 50% glicerol, 0.5 ng/ml pepstatin A, 10 ng/ml leupeptin, 0.5 mM PMSF, and 50 ng/ml aprotinin) y se lo incubó en hielo durante 20 minutos. Luego las muestras fueron centrifugadas otros 15 minutos a 10000 g. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se almacenó a $-80^\circ C$. Todos los procedimientos se realizaron a $4^\circ C$. La cuantificación de proteínas totales en los

extractos se realizó por duplicado usando el ensayo de BCA (Pierce BCA Protein Assay Kit de Thermo Fisher) siguiendo las indicaciones del fabricante.

III.4 CUANTIFICACIÓN PROTEICA DE ZIF268 Y BDNF

III.4A Separación de proteínas en función de su peso molecular:

Técnica Electroforésis SDS – PAGE

Las proteínas del extracto del punto III.3 fueron separadas en función de su peso molecular empleando la técnica SDS-PAGE que se denomina así por sus siglas en inglés *Sodium Dodecyl Sulfate – Poliacrylamide Gel Electrophoresis*. La técnica consiste en incubar las muestras con SDS y β -mercaptoetanol para desnaturalizar las proteínas presentes y luego “sembrarlas” en un gel de poliacrilamida que también contiene pequeñas cantidades del detergente SDS para mantener desnaturalizadas las proteínas y otorgarles una carga negativa uniforme y proporcional a su peso molecular. El gel es conectado a una fuente de voltaje externa y de esta forma se establece un campo eléctrico que lleva a que las proteínas migren al polo positivo del gel a una velocidad proporcional a su peso molecular. El porcentaje de acrilamida:bisacrilamida (29:1) empleado en el gel resolutivo y de empaquetado fue de 10% y 4%, respectivamente. Para la preparación de las muestras, se colocaron 20 μ g de extracto hipocampal en buffer de siembra 4x (Tris HCl 0.25M pH6.8, SDS 8%, azul de bromofenol 0.1% y glicerol 40% y β -mercaptoetanol 5%) y se agregó agua destilada hasta un volumen final de 20 μ l. Luego, se incubaron 5 min a 100°C para favorecer la desnaturalización de las proteínas y transcurrido este tiempo se las colocó inmediatamente en hielo hasta el momento de siembra. Las condiciones de corrida fueron 90 min a 110V. Transcurrido este tiempo se electro-transferieron las proteínas a una membrana de PVDF (1 h, 100 V) empleando un buffer de transferencia con 10% de metanol agregado para su posterior análisis por Western Blot.

III.4B Western Blots

Las membranas de PVDF obtenidas en el punto III.4a se incubaron con anticuerpos específicos contra las proteínas a cuantificar. El protocolo de incubación consiste de varios pasos generales. En primer lugar, la membrana se sumerge en metanol por 1 min, luego en agua destilada y por último en solución de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente y en agitación. La solución de bloqueo (SB) está hecha de leche descremada en polvo diluida al 4% en TTBS (Tris-buffered saline, 0.1% Tween-20) y se aplica para evitar el pegado inespecífico del anticuerpo a la membrana. Luego se

incuba la membrana con anticuerpo primario durante toda la noche y en agitación a 4°C. Al día siguiente se procede con el lavado del anticuerpo primario de la membrana (3 lavados en TTBS durante 5-10 min) y a continuación se la incuba con el anticuerpo secundario durante 1h a temperatura ambiente. Por último se realizan dos lavados en TTBS, uno en TBS y se procede con la detección de proteínas empleando un método quimioluminiscente (Luminol Chemiluminescence Kit-Santa Cruz). La emisión de fluorescencia de las bandas inmunoreactivas fue digitalizada con el equipo FUJIFILM-Intelligent Dark Box II empleando el software Image Reader LAS-1000 software o con el equipo G-BOX que incluye el software de análisis Gene Tools.

Al digitalizarse, la intensidad de las bandas se convierten en densidades ópticas que luego se analizaron utilizando el programa de PC *ImageJ 1.43u* diseñado por el National Institute of Health (NIH, EEUU). A partir del análisis de la densidad óptica en las membranas de los westerns se determinó la cantidad de proteína de interés presente en la muestra relativa a la cantidad total de una proteína que no fuera afectada por el tratamiento y que se emplea para contemplar la variación debida a errores en la cantidad de muestra sembrada en cada pocillo del gel (control de siembra).

Se emplearon los siguientes **anticuerpos primarios** disueltos en solución de bloqueo:

- Anti Zif268 (hecho en conejo), 1:1000, sc-110, Santa Cruz Biotechnology.
- Anti-NF- κ B p65 (hecho en conejo), 1:1000, sc-372, Santa Cruz Biotechnology.
- Anti-Lamin B (hecho en ratón), 1:500, sc56143, Santa Cruz Biotechnology. Control de siembra nuclear.
- Anti-Actina (hecho en conejo), 1:5000, sc-1616-R, Santa Cruz Biotechnology, o β -tubulin (hecho en ratón), 1:500, Calbiochem. Controles de siembra citosólicos.

Los **anticuerpos secundarios** empleados fueron:

- Anti-conejo, 1:5000 T-TBS 0.1%, sc-2030, Santa Cruz Biotechnology. Para anticuerpos hechos en conejo.
- Anti-ratón, 1:5000 T-TBS 0.1%, sc-2005, Santa Cruz Biotechnology. Para anticuerpos hechos en ratón.

Estos anticuerpos secundarios se encuentran acoplados a la enzima peroxidasa de rabanita que induce la fluorescencia del luminol en presencia de agua oxigenada.

III.5 EMSA-BLOT

Se midió la actividad de unión al ADN del factor de transcripción NF- κ B mediante el *Ensayo del cambio en la movilidad electroforética* (EMSA, por sus siglas en inglés, electrophoretic mobility shift assay). La técnica consiste en incubar 10ug de cada uno de los extractos nucleares con 1.75pmol de un oligonucleótido de ADN doble cadena (oligoADN) que codifica para una secuencia de unión a NF- κ B. La unión oligoADN-proteína altera la movilidad electroforética esperada para la proteína libre, lo que luego permite distinguirlas por electroforesis en geles de acrilamida y posterior revelado por *western blot*. La secuencia de ADN doble cadena empleada fue: 5'-AGTTGAG**GGGACTT**CCCCAGGC-3', donde en negrita se indica el sitio consenso de unión a NF- κ B. La reacción de incubación del oligoADN con las proteínas tuvo lugar en hielo durante 40 minutos. A continuación, se sembraron las mezclas en un gel de poliacrilamida (6% de una mezcla acrilamida/bis-acrilamida 29:1), no desnaturizante y se dio lugar a la electroforesis en Buffer TBE 0.25% (22.3mM tris, 22.3mM ácido bórico, 0.5mM EDTA, pH 8.3) durante 1.5h a 160V. Las muestras contenidas en el gel fueron luego transferidas a una membrana de PVDF para su posterior revelado por Western Blot. La transferencia se realizó durante 30min a 100V usando un buffer de transferencia con 10% de metanol agregado (Salles et al., 2015).

III.6 EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE ARNm

A continuación se indican los procedimientos que se llevaron a cabo con el objeto de cuantificar y comparar el ARNm de CaMKII δ presente en las muestras del grupo experimental con el ARNm presente en las muestras del grupo control. A grandes rasgos, lo primero que se hizo fue extraer el ARN total de cada muestra, luego se realizó una retrotranscripción del ARNm presente en estas muestras a cADN, que es más estable y finalmente se analizó este cADN mediante la técnica de *Reacción en Cadena de la Polimerasa* en tiempo real (también conocida como *Real Time PCR* por sus siglas en inglés). La cuantificación del cADN de CaMKII δ en cada muestra se llevo a cabo empleando primers específicos y una curva standard realizada con muestras de concentración conocida. Dado que la cantidad de cADN sintetizada en la reacción de retrotranscripción es proporcional al ARNm de partida, la cuantificación por PCR es indicativa de la cantidad de ARNm presente en la muestra original. La cantidad de cADN de CaMKII δ se normalizó al cADN de Actina que se emplea como control de

carga y finalmente estos valores se relativizaron al valor promedio del grupo control (grupo no entrenado o inyectado con droga control según el experimento).

III.6.A Extracción de ARN

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical a distintos tiempos luego del entrenamiento y rápidamente se les removió el cerebro y se realizó una disección para aislar los hipocampos según el método descrito por Glowinski e Iversen (1966). Los hipocampos fueron homogeneizados en un homogeneizador dounce “Tight” conteniendo 1ml de reactivo TRIzol[®] (Thermo-Fisher Scientific) (15 golpes). Se aisló el ARN de los otros componentes celulares basándose en el manual provisto por el fabricante. El protocolo constó de tres partes; primero se separó el homogenato en una fase acuosa y otra orgánica lo que permitió recuperar el ARN de la fase acuosa, mientras que el resto de los componentes quedaron en la fase orgánica y en la interfase. Luego, se precipitó el ARN aislado mediante el agregado consecutivo de isopropanol y etanol 70%. Finalmente, el ARN se resuspendió en 20ul de agua Milli Q tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) para destruir las enzimas ribonucleasas que pudieran estar presentes. La concentración y calidad del ARN extraído se determinó empleando el espectrofotómetro *Nanodrop 2000c* (Thermo-Fisher Scientific).

III.6.B De ARNm a cADN: reacción de retrotranscripción.

Se mezclaron 5µg de ARN con 0.5µg de primers Oligo dT, 1µl de una solución 10mM de dNTPs y se llevó a un volumen final de 12 µl con agua DEPC. Se incubó la mezcla a 65^o C durante cinco minutos y luego se procedió con el agregado de 4µl del buffer de la enzima *5xFirst-Strand buffer*, 2µl de DTT 0.1M y 0.5µl de la enzima transcriptasa reversa *M-MLV RT* (200unidades/µl, Thermo-Fisher Scientific). La mezcla se incubó a 37^oC durante 50 minutos para dar lugar a la reacción enzimática que sintetiza cADN a partir del ARNm presente en la muestra original. Transcurrido este tiempo la reacción se inactivó incubando la mezcla a 70^oC durante 15 minutos.

III.6.C Análisis por PCR en tiempo real.

El cADN obtenido en el punto anterior se cuantificó mediante una PCR en tiempo real que se llevó a cabo en el equipo *DNA Engine Opticon[®]* (Bio-Rad). Brevemente, 2µl de una solución 1/10 del cADN original se mezclaron con 5µl de Mezcla Real 2X (Biodynamics) y 3µl de una solución 3µM de primers específicos para CaMKIIδ o Actina. Para calcular la eficiencia de la reacción y corroborar que la concentración de las muestras se encuentra dentro de la región cuantitativa de la PCR, se realizó una curva

standard para cada par de primers de siete puntos construida a partir de diluciones seriales al medio de una mezcla del cADN original de todas las muestras a analizar. Los primers empleados fueron:

- CaMKII δ (Federman et al., 2013) Forward 5'-TTCGGACACGGAAAGTGAGG-3'
Reverse 5'-TTCTCACCCTGAGAACGCC-3'
- Actina (Orqueda et al., 2014) Forward 5'-CCACACCCGCCACCAGTTC-3'
Reverse 5'-GACCCATTCCCACCATCACACC-3'

Ambos pares de primers fueron diseñados para amplificar regiones que se encuentran entre dos exones distintos y así asegurarse de estar amplificando cADN proveniente de ARN maduro (ARNm).

Los valores de cADN de CaMKII δ para cada muestra fueron normalizados a los valores de cADN para Actina y expresados relativos al promedio del grupo control en cada caso.

III.7 CIRUGÍA E INFUSIÓN DE DROGAS

Para la infusión de diversos agentes en el hipocampo los ratones fueron sometidos a una cirugía en la cual se le implantaron unas cánulas-guía (23G de diámetro, 8mm de largo) dirigidas a la región CA1 del hipocampo dorsal. Este procedimiento quirúrgico se denomina *canulación*. El primer paso en la canulación, consistió en anestesiarse a los ratones mediante una inyección intraperitoneal de una mezcla de ketamina/clorhidrato de xilacina (80 μ l de ketamina 5% p/v y 10 μ l de clorhidrato de xilacina 20 mg/ml). Luego se colocó al animal en un aparato *estereotáxico*. Este dispositivo permite orientar y fijar la cabeza del ratón y utiliza un sistema de coordenadas tridimensional para colocar pequeñas estructuras, como una cánula-guía, dentro del cerebro del animal en las coordenadas espaciales deseadas. A continuación, se cortó el cuero cabelludo de manera tal de dejar expuesto el cráneo y se ubicó el *bregma* (Figura III.7iA). El *bregma* es el punto de unión de las suturas sagital y coronal del cráneo y se emplea como punto de referencia a partir del cual uno se desplaza en el eje anterior-posterior (AP), el eje dorsal-ventral (DV) y el eje lateral-medial (LM). Según el atlas estereotáxico de ratón publicado por Paxinos y Franklin (Paxinos and Franklin, 2004), la región dorsal del hipocampo se encuentra en las coordenadas AP - 1.9, ML \pm 1.2 y DV 1.2, estos valores se refieren a milímetros de desplazamiento desde el bregma en cada uno de los 3 ejes. El cráneo del animal fue perforado en las

posiciones AP y ML indicadas (Figura III.7iB), nótese que las perforaciones son bilaterales), y luego se colocaron las cánulas a la altura DV necesaria. Las cánulas fueron fijadas al cerebro primero con pegamento “La gotita” y luego con acrílico dental HydroC. La figura III.7iC muestra un animal canulado. Los procedimientos conductuales se iniciaron luego de dos días de recuperación. La localización neuroanatómica de las cánulas se chequeo al final de cada experimento comportamental. Para ello, los animales fueron sacrificados y sus cerebros fueron extraídos cuidadosamente y fijados con una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% en buffer fosfato luego, con un vibrátomo se cortó el cerebro en rodajas de aproximadamente 200 μm y se analizaron los cortes en un microscopio óptico acoplado a una cámara fotográfica (Figura III.7ii). Los animales con cánulas no posicionadas en el hipocampo dorsal no fueron considerados en el posterior análisis.

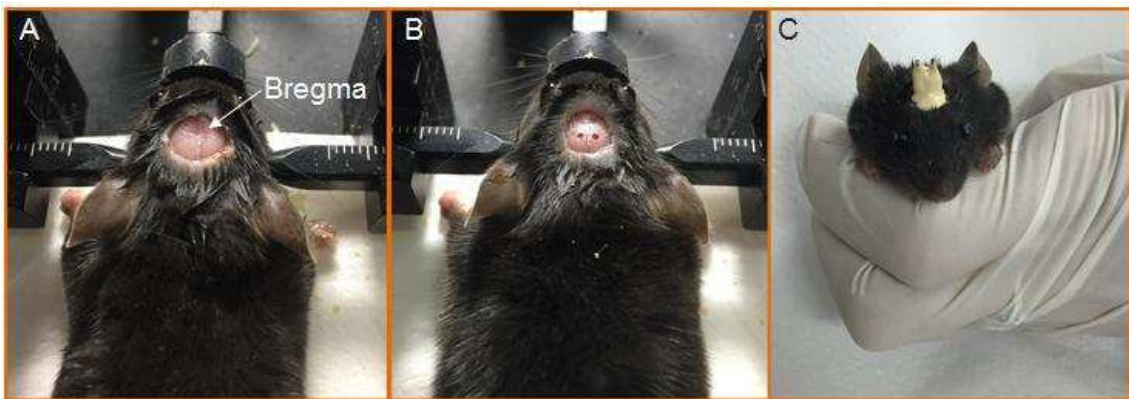


Figura III.7i. Distintos pasos en el procedimiento de canulación. **A.** Ratón ubicado en el estereotáxico con el cráneo expuesto. La flecha indica el punto Bregma que fue utilizado como referencia. **B.** Se muestran los agujeros en los que se ubicaron las cánulas. **C.** Foto de un animal canulado.

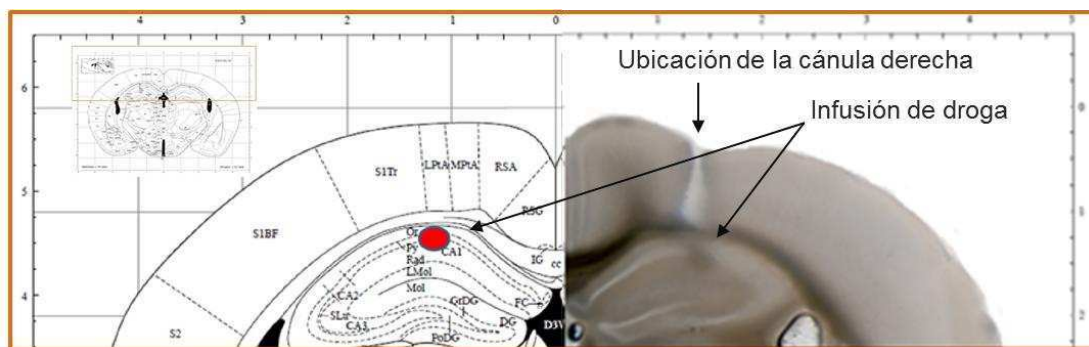


Figura III.7ii. Diagrama de un corte coronal del atlas del cerebro de ratón (izquierda) acoplado a una imagen que muestra el corte coronal de un cerebro de raton canulado (derecha). Las flechas señalan la marca que indica que allí se ubicó una de las cánulas (se espera la misma del

lado izquierdo aunque nos e muestre) y la infusión de la droga, que fue bilateral y dirigida a la región CA1 del hipocampo dorsal.

Dispositivo de infusión.

Las infusiones intrahipocampales se realizaron a distintos tiempos luego del entrenamiento según se indica en cada experimento. Las drogas empleadas se administraron a través de una aguja de 30G y 9 mm de diámetro que se introduce en las cánulas guía. La aguja se conecta por medio de un tubo de goma a una jeringa Hamilton que permite administrar drogas en cantidades micrométricas. En todos los casos, se administró 1ul de droga de manera bilateral.

III.8 DROGAS

III.8.A NF- κ B Decoy: Inhibidor de la actividad de NF- κ B.

Para inhibir la actividad de unión al ADN del factor de transcripción (FT) NF- κ B, se administró por via intrahipocampal (sección anterior, III.7) la droga NF- κ B Decoy que es un oligodeoxinucleótido doble cadena que contiene la secuencia consenso de unión a NF- κ B. Por lo tanto, este oligodeoxinucleótido “secuestra” a dicho FT y no permite que se una al ADN. Como droga control se empleó un oligodeoxinucleótido de iguales características pero con una base mutada de manera tal que este oligo no interacciona con NF- κ B.

Decoy: 5'-GAGGGGACTTTCCCA-3'; secuencia consenso en negrita. (Bio-Synthesis Inc).

mDecoy: 5'-GAGGCGACTTTCCCA-3'; base mutada subrayada. (Bio-Synthesis Inc).

Ambos fueron disueltos en solución STE (10 mM Tris pH 7,5-8; 50 mM NaCl; 1 mM EDTA). Tanto el Decoy como el mDecoy se utilizaron en una concentración de 0.47 μ g/ μ l y la dosis inyectada en cada hipocampo equivale a 0.26 pmol (Freudenthal et al., 2005; Boccia et al., 2007).

III.8.B Oligodeoxinucleótidos modificados complementarios a ARNm. Inhibición de la expresión proteica.

Para inhibir la expresión proteica de ZIF268 y CaMKII δ se emplearon *oligodeoxinucleótidos complementarios* (OC) a una porción del ARNm de la proteína cuya expresión se desea bloquear. La hibridización de este oligo con el ARNm nativo puede inhibir la síntesis de la proteína en cuestión principalmente por dos vías:

induciendo la degradación del ARNm mediante la ribonucleasa H o bloqueando la traducción ribosomal (Scanlon et al., 1995) (Figura III.8i). Como droga control se empleó un oligodeoxinucleótido que posee las mismas bases que el OC pero ordenadas de manera aleatoria y que no tiene ninguna homología significativa con otros ARNm de la especie *Mus Musculus*, a este oligo control lo denominaremos *oligodeoxinucleótido aleatorio* u OA. Ambos oligonucleótidos poseen sus primeras y últimas tres bases unidas por enlaces covalentes fosforotiolados lo que le confiere mayor estabilidad a la degradación enzimática en relación a un oligo convencional que tiene sus bases unidas por enlaces fosfodiéster. En rata, la infusión de oligonucleótidos fosforotiolados en sus primeras y últimas tres bases permanece en la célula hasta 5hs post-infusión, pero a las 24hs ya no se observa (Katche et al., 2010). En algunos casos la bajada de proteínas se ve hasta 4 y 6 hs post infusión (Katche et al., 2012b) y 6hs (Bekinschtein, 2007).

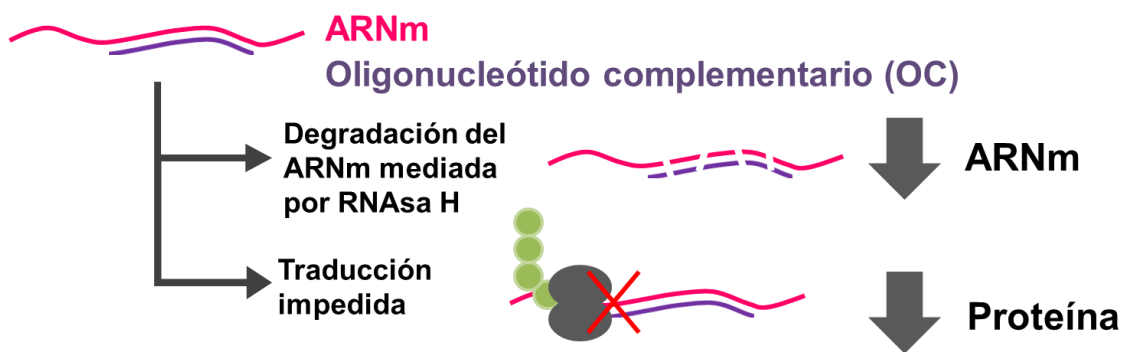


Figura III.8i. Mecanismo de acción de los oligonucleótidos complementarios a ARNm .

Inhibición de ZIF268.

Para inhibir la expresión proteica de ZIF268 se administró un OC que fue diseñado anteriormente y empleado en ratas (Lee et al., 2006; Katche et al., 2012b). La secuencia del oligo es complementaria a una región del ARNm de Zif268 que se encuentra cerca del sitio de inicio de traducción (Número de acceso GenBank NM 007913.5, bases 362–379).

Zif 268 OC: 5' G-G-T-AGTTGTCCATGG-T-G-G 3' (Genbiotech S.R.L.)

Zif268 OA: 5' G-T-G-TTCGGTAGGGTG-T-C-A 3' (Genbiotech S.R.L.)

En la sección VII.1 se muestran los estudios de complementariedad de ambos oligonucleótidos a los transcritos de la especie Mus Musculus. Este análisis se llevó a cabo para corroborar que el OC y el OA no interfirieran con la expresión de otros genes.

Inhibición de CaMKII δ

Los oligodeoxinucleótidos fueron diseñados siguiendo las recomendaciones del manual provisto por *Integrated DNA Technologies* (IDT), usando la herramienta online OligoAnalyzer 3.1 de IDT, que brinda información termodinámica sobre la estabilidad del oligo diseñado, y verificando que el OC fuese específico para el ARN mensajero de CaMKII δ y que el OA no se uniera significativamente a ningún ARNm (ver VII.2).

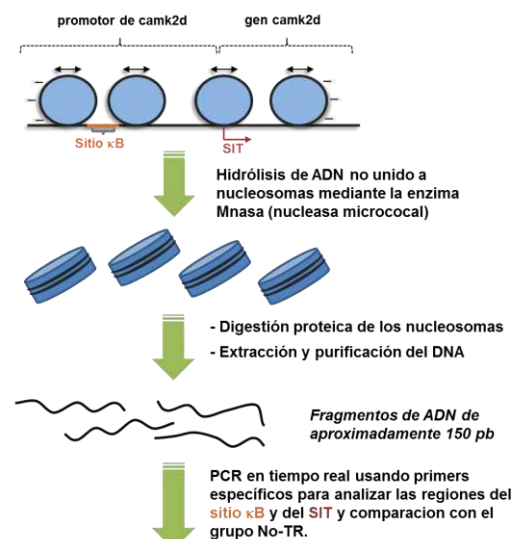
CaMKII δ OC: 5' C-T-T-TCCGAGCTCCTCAA-A-G-A 3' (Genbiotech S.R.L.)

CaMKII δ OA: 5' C-A-T-TCACTCACGTTACG-A-G-C 3' (Genbiotech S.R.L.)

En todos los casos, los oligos fueron re-suspendidos en solución salina estéril a una concentración de 1nmol/ μ l y se inyectó 0.4nmol o 1nmol por lado, según el experimento. Para el estudio del efecto comportamental de la inhibición de ZIF268 se agregó un grupo control inyectado con salina (vehículo).

III.9 ANÁLISIS DE POSICIONAMIENTO NUCLEOSOMAL EN LOS SITIOS κ B Y SIT DEL GEN DE CAMKII δ

Para estudiar la presencia de nucleosomas en las regiones que contienen la secuencia consenso del FT NF- κ B (sitio κ B) y la secuencia de inicio de la transcripción del gen (SIT), se llevó a cabo el *Ensayo de Nucleasa Micrococcal*, una técnica que permite cuantificar la cantidad de ADN formando parte de nucleosomas dentro de estas regiones (Figura III.9i).



Grado de ocupación nucleosomal en los sitios κ B y SIT

Figura III.9i. Procedimiento experimental involucrado en la determinación del grado de ocupación nucleosomal en los sitios κ B y SIT.

III.9A Ensayo de Nucleasa Micrococcal

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical a diferentes intervalos después de un entrenamiento NOR. Sus cerebros se retiraron rápidamente y ambos hipocampos fueron disecados y almacenados a -80°C . Para el aislamiento de los núcleos, el tejido del hipocampo se homogeneizó con 3 ml de Buffer 1 (0.3M Sacarosa en 60mM KCl, 15mM NaCl, 5mM MgCl_2 , 0.1mM EGTA, 15mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5mM DTT, 0.1mM PMSF y 3.6ng/ml de Aprotinina) utilizando un homogeneizador de teflón-vidrio (15 golpes). Luego, se centrifugaron las muestras (1000 rpm, 10 min, 4°C) y se resuspendieron en 1 ml de Buffer 1 y 1 ml de Buffer 2 (Idem al Buffer 1 pero con 0.4% v/v de IGEPAL CA-630); estos pasos inducen la lisis de la membrana celular y la liberación de los núcleos de las neuronas. Los núcleos se separan entonces de los componentes citosólicos por centrifugación en colchón de sacarosa utilizando Buffer 3 (Idem al Buffer 1 pero con 1.2M de sacarosa). Los núcleos se recogieron de la parte inferior del tubo, se resuspendieron en 500 μl de Buffer de Digestión y se incubaron con la enzima nucleasa micrococcal (MNasa) que digiere ADN no unido a nucleosoma. Para aislar el ADN de los nucleosomas se llevó a cabo una extracción con fenol-cloroformo-álcool isoamílico. Por último, el ADN se precipitó de la fase acuosa utilizando etanol, glicógeno y acetato de sodio 3 M y se resuspendió en 30 μl de agua MilliQ. Dado que el estudio requiere que la digestión con la MNasa sea completa, es decir que digiera todo el ADN hasta quedarnos con mononucleosomas, se verificó que los fragmentos de ADN recuperados tuvieran aproximadamente 147pb (figura III.9ii).

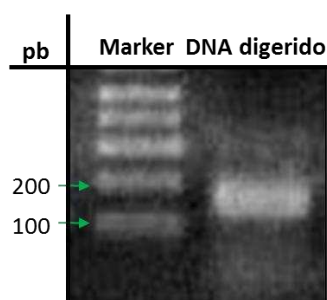


Figura III.9.ii. La digestión con MNasa degrada el ADN hasta dejar mononucleosomas de aproximadamente 147 pb. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. En la calle de la izquierda se sembró el marcador de peso molecular del ADN y en la de la derecha una muestra del ADN resuspendido al final del proceso.

III.9.B. Ocupación Nucleosomal en los sitios κB y SIT: análisis por PCR en tiempo real.

El ADN de los nucleosomas se analizó por PCR cuantitativa en tiempo real de forma análoga al punto III.6.C.

Los primers empleados para amplificar las regiones de interés fueron:

- SIT de CaMKII δ

Fwd 5'-CGGGGAGAGGAGGGAGGAG-3'

Rvse 5'-CCGCAAGGCTGGGAACCC-3'

- Sitio κ B de *camk2d*:

Fwd 5'-GCACTTTTGGGTTTCATTATGTTAG-3'

Rvse 5'-CGTCTTCGCCCTTCTCTCC-3'

- Sitio κ B del gen *gria1* (codifica para la subunidad del receptor de Glu-A1 AMPA):

Fwd 5'-TATGCCTTTCTCACAGTCTTTC-3'

Rvse 5'-ATTATTCCTACAACCTAATTCCCAAG-3'

- Sitio κ B del gen *grin2a* (codifica para el receptor de la subunidad NMDA NR2A ϵ 1):

Fwd 5'-TGCTGAGGTCATCATCCC-3'

Rvse 5'-TAATATACTTCTGGCTTCAATGC-3'

Estos primers fueron diseñados *de-novo* empleando el software *Beacon Designer* y corroborando su especificidad mediante la herramienta online *PrimerBlast* del NCBI, NIH, USA. Como parte de la puesta a punto de las PCRs, se analizaron los productos obtenidos al final de la reacción en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y se corroboró que el tamaño del producto amplificado coincidiera con el esperado en cada caso.

Además, para normalizar estos valores a la cantidad de ADN total de partida, en cada caso se realizaron reacciones de PCR en paralelo empleando primers para una secuencia dentro del gen de fibronectina que se supone contiene nucleosomas que no se ven afectados por la experiencia comportamental del animal. Luego de normalizar los resultados de cada muestra a los valores de fibronectina, se calculó el valor promedio para cada grupo relativo al promedio del grupo No-TR en cada caso.

III.10 INMUNOFLUORESCENCIA

Para estos experimentos se emplearon ratones Naïve CF1 o C57BL/6 o transgénicos Thy1 (Tg Thy1-EGFP MJrs/J -<http://jaxmice.jax.org/strain/007788.html>-), según se indique. Todos los ratones empleados fueron machos y de entre 6 y 8 semanas de edad. Los ratones fueron profundamente anestesiados con ketamina / xilazina y perfundidos transcardíacamente con solución salina, seguido de 4% de paraformaldehído (PFA) en Buffer Fosfato 0.1M (PB). Se extrajeron los cerebros y se

fijaron posteriormente durante 6 hs en 4% PFA en 0.1M PB (4°C) y se transfirieron a 10% de sacarosa hecho en Buffer Fosfato-Salino (PBS, 4°C, toda la noche- en inglés *Over Night* - ON), luego a 20% de sacarosa en PBS (4 ° C, O.N.), y finalmente a 30% de sacarosa en PBS (4°C, ON). Los cerebros se cortaron en secciones coronales de 40 µm empleando un criostato, y fueron almacenados en solución criopreservadora hasta su uso.

III.10A. Incubaciones

> ZiF268.

Se trabajó con cortes coronales de animales CF1. Las secciones del cerebro se permeabilizaron con 1% de Tritón X-100 PBS durante 5 min a temperatura ambiente (TAmb), seguido de 3 incubaciones en 0.3% de Tritón X-100 PBS (solución de lavado). A continuación, se bloquearon las secciones en 2.5% de suero de cabra normal no inmune (50197Z; Invitrogen) preparado en 0.3% de Tritón X-100 PBS durante 1 hora a TAmb. Luego se emplearon tres protocolos de incubación en paralelo (4°C, ON):

- Se realizó una incubación con una solución conteniendo el anticuerpo primario para Zif268 pre-adsorbido con el péptido empleado como antígeno para el anticuerpo. La pre-adsorción se llevó a cabo incubando el anticuerpo con el péptido en una cantidad 20 veces mayor en peso que el anticuerpo durante 30 min a TAmb.
- Otra incubación se realizó con anticuerpo primario anti-Zif268 hecho en conejo (1: 200 en 2.5% de suero de cabra normal hecho en 0.3% de Tritón X-100 PBS, sc-110, *Santa Cruz Biotechnology*) conteniendo BSA en una cantidad molar equivalente a la del péptido del punto anterior. Este agregado se efectúa para corroborar que la unión del péptido a la cantidad empleada no sea inespecífica.
- Se corroboró que la marca inmunofluorescente observada fuera del anticuerpo primario y no del pegado inespecífico del secundario, realizando en paralelo el mismo protocolo de incubación en otras rodajas pero en lugar de incubar ON con anticuerpo para Zif268, se dejó ON en la solución de incubación sin anticuerpo..

Finalizada la incubación, se realizaron tres lavados con solución de lavado y se incubaron los cortes con anticuerpo secundario diluido en 2.5% de suero de cabra normal no inmune, durante 1.5 h a TAmb (1:250, anti-conejo hecho en cabra conjugado con Alexa Fluor® 488nm, *Thermo Fisher Scientific*). Luego, se lavaron 3 veces con PBS, y se montaron en porta-objetos de vidrio empleando un medio que contiene Ioduro de Propidio (F5932, *Sigma-Aldrich*), que se une a las hebras de ADN,

permitiendo visualizar los núcleos. El Ioduro de propidio absorbe en el verde y emite en el rojo (picos máximos de absorción y emisión: 520 nm y 620 nm, respectivamente).

> **Estudio de localización de CaMKII δ en dendritas.**

Para la localización de CaMKII δ en dendritas, se utilizaron secciones de cerebro de ratones Thy1. Las secciones del cerebro se permeabilizaron con 1% de Tritón X-100 PBS durante 5 min a temperatura ambiente (TAmb), seguido de 3 incubaciones en 0.3% de Tritón X-100 PBS (solución de lavado). A continuación, se bloquearon las secciones en 2.5% de suero de cabra normal no inmune (50197Z; Invitrogen) preparado en 0.3% de Tritón X-100 PBS durante 1 hora a TAmb, y posteriormente se incubaron con anticuerpo primario anti-CaMKII δ hecho en conejo (4°C, ON; 1: 200 en 2.5% de suero de cabra normal hecho en 0.3% de Tritón X-100 PBS, cat.no.:A010-56AP, *Badrilla*[®]). Después de 3 pasajes de solución de lavado, las secciones se incubaron con anticuerpo secundario diluído en 2.5% de suero de cabra normal no inmune, durante 1.5 h a TAmb (1:250, anti-conejo hecho en cabra conjugado con Alexa Fluor[®] 594nm, *Thermo Fisher Scientific*). Luego, se lavaron 3 veces con PBS, y se montaron en porta-objetos de vidrio empleando el medio de montaje Vectashield (H-1000; Vector Laboratories[®]). Para corroborar que la marca inmunofluorescente observada fuera del anticuerpo primario y no del pegado inespecífico del secundario, se repitió el mismo protocolo de incubación en otras rodajas pero en lugar de incubar ON con anticuerpo para CaMKII δ , se dejó ON en la solución de incubación. Luego se comparó la inmunofluorescencia emitida por ambos al microscopio confocal (ver III.10.B).

> **Estudio de localización de CaMKII δ en sinapsis.**

Para la localización de CaMKII δ en sinapsis, se utilizaron secciones coronales de cerebro de ratones Thy1 y se siguió un protocolo de incubación similar al anterior. La diferencia es que en este caso, luego de la incubación con CaMKII δ , se realizaron los lavados correspondientes y se incubó O.N. con anticuerpo anti-vGlut-1 hecho en ratón (1:200 en solución de incubación, cat. No. AB5905, *EMD Millipore Corporation*). Luego se realizaron 3 pasajes en solución de lavado y se incubó con anticuerpo secundario (1:250 en 3%BSA en PBS, anti-ratón hecho en burro conjugado con citocromo 5 –Cy5-, ab6563, *Abcam*). Finalmente, se realizaron 3 lavados con PBS y se montaron en porta-objetos como en el caso anterior. En forma paralela, se realizaron dos incubaciones “control” para corroborar que no hubiera pegado inespecífico entre los anticuerpos primarios y secundarios y que no estén absorbiendo ni emitiendo a las longitudes de onda que les corresponden a los otros anticuerpos secundarios. Por ejemplo, nos interesa asegurarnos que, al visualizar CaMKII δ , los anticuerpos empleados para detectar vGlut-1 no absorban ni emitan significativamente en las longitudes de onda con las que se trabaja en este caso, del mismo modo, nos interesa que el anticuerpo

secundario para CaMKII δ no se esté pegando inespecíficamente ni al tejido ni a alguno de los otros anticuerpos. Lo mismo tenemos que asegurarnos cuando queremos visualizar vGlut-1. Para resolver esta cuestión, en una de las incubaciones se llevó a cabo el mismo protocolo de incubación sin agregar anticuerpo contra CaMKII δ , y en la otra se incubó tal cual sin agregar el anticuerpo para vGlut-1. Luego se compararon los patrones de fluorescencia de la incubación original (con anti-CaMKII δ y anti-vGlut-1) con la de cada uno de sus controles (ver III.10.B).

> **Estudio de localización de CaMKII δ en el núcleo.**

En este caso, se trabajó con cortes coronales de animales C57BL/6Naïve. El protocolo de incubación fue similar al llevado a cabo para el estudio de localización en dendritas, pero en este caso el anticuerpo secundario empleado absorbe en el azul y emite en el verde (anti-conejo hecho en cabra conjugado con Alexa Fluor[®] 488nm). La diferencia radicó al momento de montar los cortes en el porta-objetos. En este caso, se montaron en un medio que contiene Ioduro de Propidio (F5932, *Sigma-Aldrich*), que se une a las hebras de ADN, permitiendo visualizar los núcleos. El Ioduro de propidio absorbe en el verde y emite en el rojo (picos máximos de absorción y emisión: 520 y 620 nm, respectivamente). Se corroboró que la marca inmunofluorescente observada fuera del anticuerpo primario y no del pegado inespecífico del secundario, realizando en paralelo el mismo protocolo de incubación en otras rodajas pero en lugar de incubar ON con anticuerpo para CaMKII δ , se dejó ON en la solución de incubación sin anticuerpo.

III.10B. Visualización al microscopio confocal.

Los cortes anteriores fueron visualizados en un microscopio confocal Olympus FV300. La toma de imágenes se realizó con el software del microscopio, y en todos los casos se llevó a cabo en forma secuencial, es decir que se tomaron imágenes para cada uno de los componentes fluorescentes por separado, pero uno a continuación del otro. Para el estudio en **dendritas**, durante la toma de imágenes se empleó primero el láser de Helio-Neón (594nm) para visualizar la emisión de la marca de CaMKII δ y luego el láser de Argón (488nm) para visualizar la emisión de GFP. Para el estudio en **sinapsis** se empleó primero el láser Helio-Neón (633) para visualizar la marca de vGlut-1, luego el láser de Helio-Neón (594nm) para visualizar la emisión de la marca de CaMKII δ y por último el láser de Argón (488nm) para visualizar la emisión de GFP. Para los estudios de localización nuclear se empleó primero el láser de Helio-Neón (594nm) para visualizar la emisión de la emisión de Ioduro de Propidio y luego el láser de Argón (488nm) para visualizar la marca de Zif268 o CaMKII δ , según el experimento. En cada uno de los estudios y para cada una de las marcas a analizar, se realizó una primera visualización rápida de los cortes y se definieron los parámetros ópticos óptimos (intensidad y

potencia del láser, fotomultiplicador, ganancia, umbral y apertura confocal) que se mantuvieron fijos a lo largo de toda la sesión de toma de imágenes. Los filtros de los canales de detección fueron elegidos de manera apropiada en cada caso. Los objetivos empleados fueron UPLFL20x (apertura confocal 1.0) y PLAPO60x (apertura confocal 2.0) según se indique a continuación. En los casos en los que se empleó el objetivo 60x, se agregó una gota de aceite de inmersión (Olympus) sobre el cubre-objetos. Por cada imagen tomada (en cada plano), se realizó un escaneo por duplicado y se aplicó el filtro Kalman que disminuye el ruido. En primer lugar, en cortes incubados para el análisis en dendritas, se estudió la presencia de CaMKII δ en las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo empleando una lente-objetivo de 20x y un zoom 1.5x. No se realizaron análisis en el giro dentado ya que en esta zona la marca GFP de neuronas de animales Thy-1 es muy intensa y se superpone con la de distintas neuronas vecinas, por lo que no es posible distinguir la morfología de una neurona individual. Luego, se estudió su presencia en dendritas empleando una magnificación 60x y un zoom 1.5x. Para este estudio se realizaron “stacks” de imágenes, es decir que se tomaron aproximadamente 50 imágenes en distintos planos del eje z, separados una distancia de 0.2 μ m entre sí. Las imágenes para el estudio en sinapsis se llevó a cabo con el objetivo 60x y un zoom 8x. Nuevamente se realizaron “stacks” con una distancia entre planos de 0.2 μ m. Por último, para los estudios de localización nuclear, se empleó un objetivo 60x y zoom 1x. Se tomaron aproximadamente 20 imágenes en distintos planos del eje z, separados una distancia de 0.5 μ m entre sí. A continuación, se procesaron las imágenes utilizando el software ImageJ 1.48v.

III.10C. Análisis de imágenes.

En primer lugar, en todos los casos, se corroboró que las incubaciones “control”, es decir en ausencia de alguno de los anticuerpos primarios, no emitieran fluorescencia que pudiera interferir con la marca específica que se desea analizar. Luego, dado que la fluorescencia en estos casos no suele ser nula, sino que tiene un valor bajo y uniforme a lo largo de toda la imagen, se midió la intensidad promedio en un rectángulo y se le restó esta intensidad a las imágenes que serían analizadas en cada caso, ya que se considera que esta señal es “de fondo”.

> Estudio de localización en dendritas.

El estudio se llevó a cabo sobre dendritas que denominamos “principales”, es decir aquellas a partir de las cuales nacían ramificaciones hacia dendritas más pequeñas. Esto se decidió así por el hecho de que las dendritas ramificadas poseen una alta relación espinas/área lo que dificulta mucho separar la marca de la espina de la dendrita propiamente dicha. Las dendritas principales son más voluminosas y las espinas presentes en ellas son menores. Habiendo identificado la dendrita, se eligieron

tres regiones, a lo largo de la misma, sobre las cuales se analizaron los perfiles de fluorescencia de GFP y de CaMKII δ (intensidad dentro de la dendrita). El perfil de fluorescencia de GFP permitió delimitar los bordes de la dendrita en cada caso (ver curva verde en el gráfico de la figura IV.II.6). Luego se sumó la intensidad de fluorescencia en cada punto dentro de la dendrita y se obtuvo así la intensidad de fluorescencia (en unidades arbitrarias) total dentro de la dendrita. En muchos casos estas regiones se encontraban en distintos planos en el eje z. Como control se eligieron otras tres regiones, de igual área, que se encontraban fuera de la dendrita pero cerca de ella y se midió el perfil de fluorescencia de CaMKII δ . Luego se calculó la intensidad total dentro de un área equivalente a la empleada para el cálculo dentro de la dendrita, y de este modo, se calculó la intensidad total fuera de la dendrita. Luego se calculó la relación de la intensidad de CaMKII δ dentro y fuera de la dendrita (i_{dentro}/i_{fuera}). A continuación, se tomaron estos tres valores de i_{dentro}/i_{fuera} , se calculó un valor promedio y a partir de este se construyó un intervalo de confianza ($t_{0.05/2,2}=3.182$) para el valor de esta relación (se supuso que estos valores siguen una distribución normal). Si el intervalo de confianza se encontraba por encima de 1, consideramos que esa dendrita contenía CaMKII δ en su interior, de lo contrario concluíamos que, al emitir una intensidad de fluorescencia equivalente a la observada en regiones aleatorias, no contenía CaMKII δ en su interior.

> **Estudio de localización en sinapsis.**

En primer lugar, realizando la superposición entre imágenes que revelan la marca de GFP y la de vGlut-1, se identificaron sinapsis donde las terminales pre y post-sinápticas pudieran diferenciarse correctamente en función de su perfil de fluorescencia (en varios casos la pre y la post se superponía, en otros casos no se observaba terminal pre sináptico-puede que no fuera una sinapsis excitatoria- y en otros, se dificultaba distinguir la espina de la dendrita). Tal como se observa en el gráfico de la figura IV.II.6iii, trazando un rectángulo y obteniendo el perfil de fluorescencia correspondiente, las formas de las curvas de GFP y vGlut-1 permiten delimitar ambos compartimentos. Luego, se evaluó la intensidad de fluorescencia de CaMKII δ en cada uno de estos (pre y post) y, en forma análoga a lo realizado en el estudio en dendritas, se calculó la relación i_{pre}/i_{post} para cada espina estudiada. Dado que en muchos casos el área de la pre- y la post- no era la misma, se aplicó un factor, f , que corrige la intensidad de fluorescencia en función del área relativa entre ambos compartimentos. De este modo, el cálculo final realizado fue: $(i_{pre}/i_{post}) \cdot f$, donde $f = n_{post}/n_{pre}$, y n es la cantidad de puntos sobre los cuales se sumó la intensidad de fluorescencia en cada compartimento. Luego, para decidir si CaMKII δ se encuentra mayoritariamente en la pre, en la post, o de manera equitativa en ambos, se adoptó el siguiente criterio: si el cálculo de la relación anterior para la sinapsis en cuestión da 1.0, se considera que se encuentra equitativamente en ambos. Si es igual o mayor a 1.1 se encuentra

predominantemente en la pre, y si es igual o menor a 0.9, se encuentra predominantemente en la post. Una de las limitaciones de esta metodología es que solo permite estimar un valor relativo entre ambos compartimentos, es decir que determina que se encuentra predominantemente en un compartimento pero no nos indica que no esté en el otro. Este inconveniente surge del hecho de que en las imágenes tomadas, no hay una región en la que uno pueda asegurar que no hay CaMKII δ y que pueda emplearse como valor de referencia. Sin embargo, el análisis visual del perfil de fluorescencia de CaMKII δ en relación al de vGlut-1 y al de GFP, indica que en la mayoría de los casos, CaMKII δ se encuentra en uno u otro compartimento, es decir que la relación calculada es una buena aproximación de su presencia en uno u otro compartimento, y no meramente una relación de intensidad entre ambos.

> **Estudio de localización en núcleo.**

De manera análoga a lo realizado en los casos anteriores, se eligieron varias neuronas al azar de distintos cortes, y en cada una se trazó un rectángulo que contuviera al núcleo. Luego, se determinó el perfil de fluorescencia y se estimó la intensidad de fluorescencia dentro del núcleo. A continuación, se repitió este procedimiento sobre un rectángulo de igual área ubicado en una región en la que no hubieran núcleos, pero que estuviera cerca de la región analizada. Nuevamente, se midió la intensidad de fluorescencia en un área equivalente y se calculó la relación i_{dentro}/i_{fuera} . A continuación, se analizó la relación obtenida para los distintos núcleos y luego, empleando los valores obtenidos para el total de las neuronas analizadas, se calculó un valor promedio y se construyó un intervalo de confianza (del 95%) suponiendo que los datos siguen una distribución normal. Se consideró que un intervalo de confianza mayor a 1 indica que la presencia de CaMKII δ en el núcleo.

III.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para las comparaciones entre dos grupos se utilizó la prueba T de Student, y en el caso de las comparaciones múltiples se realizó un ANOVA de 1 factor y se aplicó el test post hoc de Duncan. Los supuestos de normalidad y homocedasticidad de los residuos para cada caso, se evaluaron empleando el estadístico de Shapiro Wilks y la prueba Brown-Forsythe, respectivamente. En algunos casos, los datos provenientes de experimentos en los que se evaluó cantidad de ARNm presentaban pequeñas desviaciones a la normalidad, sin embargo, dado que el estadístico ANOVA es robusto a pequeñas desviaciones en este supuesto, se consideró que era válido aplicarlo para el análisis de estos datos (Kirk, 2012). En un caso la prueba de homocedasticidad no se cumplió y se empleó la Prueba Welch para muestras con varianzas no equivalentes que es una

adaptación de la prueba t de Student. En todos los casos se usó un $\alpha=0.05$ como criterio de significancia. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con los programas *Graphpad Prism* o *InfoStat*. Los intervalos de confianza se construyeron empleando la siguiente formula: $(x-EEt_{\alpha/2, n-1}; x+EEt_{\alpha/2, n-1})$ donde x es el promedio de los valores, EE el Error Estándar y el valor t se obtuvo de las tablas correspondientes suponiendo distribución normal. Todos los datos se graficaron como media \pm EE.

IV. RESULTADOS

La primer parte de los resultados esta avocada al estudio de la regulación de NF- κ B en la expresión de los genes de respuesta temprana, BDNF y ZIF268, en el hipocampo durante la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos. En estos experimentos se emplearon ratones de la cepa CF1.

En la segunda parte, estudiamos la inducción y regulación de la expresión de *camk2d* durante la formación y mantenimiento de la memoria de reconocimiento de objetos de largo termino. En estos se emplearon ratones de la cepa C57 ya que los experimentos surgieron como continuación de un trabajo previo del laboratorio en los que se había empleado esta cepa (Federman et al., 2013).

PARTE I

IV.I.1 UN ENTRENAMIENTO FUERTE INDUCE LA CONSOLIDACIÓN DE LA MRO EN RATONES DE LA CEPA CF1

El primer paso para el estudio en cuestión fue hallar un protocolo que indujera la formación de una **memoria de reconocimiento de objetos de largo término** en la cepa **CF1**. En el laboratorio se contaba con el antecedente de que 15 minutos de entrenamiento o exposición a los objetos inducen una memoria de largo termino en ratones de la cepa C57BL/6 (Federman et al., 2013), por lo que se puso a prueba el mismo tiempo de entrenamiento en ratones de la cepa CF1.

El diseño experimental se muestra la figura IV.I.1i. La sesión de entrenamiento (TR), representada por el rectángulo negro, duró 15 minutos y 24 hs más tarde se llevó a cabo la sesión de evaluación (TS, cuadrados blancos). Se trabajó con un grupo No-TR (grupo control, rectángulo blanco) cuyos animales el día del entrenamiento fueron colocados en la arena experimental en ausencia de objetos y con un grupo \bar{f} TR que fue colocado en la arena experimental en presencia de dos objetos iguales.

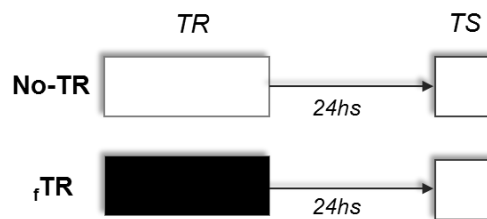


Figura IV.I.1i. Diseño experimental.

El índice de discriminación (ID%) promedio para el grupo \bar{f} TR fue significativamente mayor al del grupo no entrenado (figura IV.I.1ii., $\%ID_{\bar{f}TR} = (41 \pm 7)$, $\%ID_{No-TR} = (2 \pm 5)$, $(t=4.707, p=0.0002)$ lo que indica que **15 minutos de entrenamiento son suficientes para formar una memoria de reconocimiento de objetos de largo término**. El tiempo total de exploración durante la sesión de testeo fue: $\bar{f}TR = (25.88 \pm 3.44)s$, $No-TR = (46.39 \pm 4.69)s$. Estos valores son significativamente distintos entre sí ($p=0.0026$) debido a que los animales del grupo No-TR fueron expuestos a dos objetos distintos y ambos novedosos, mientras que para el grupo \bar{f} TR sólo uno era novedoso.

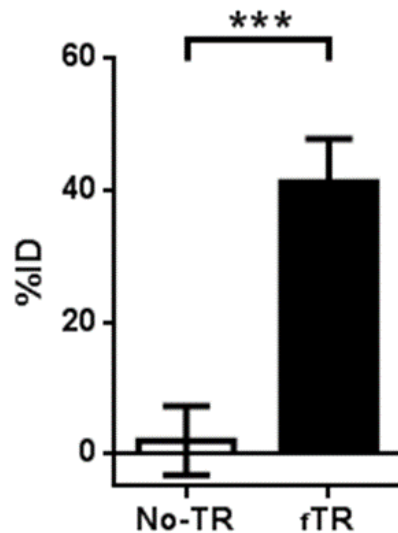


Figura IV.1.1ii. 15 minutos de entrenamiento inducen una memoria de reconocimiento de objetos de largo término en ratones de la cepa CF1. En el gráfico se indica el ID% promedio para el grupo no entrenado ($n_{No-TR}=11$) y el entrenado ($n_{fTR}=10$). Los valores se expresan como promedio \pm error estándar y fueron comparados empleado la prueba t de Student. $p^{***}<0.0005$.

En el día del testeo, los tiempos de exploración de cada objeto en el grupo No-TR se emplearon también para estudiar posibles preferencias por uno u otro objeto. Para ello, se calculó un índice de discriminación considerando como objeto “novedoso” al rasti (ID_R%) y se evaluó si el intervalo de confianza para el ID_R% promedio se encontraba por encima o por debajo de 0% lo que indicaría preferencia por el rasti o por el vaso, respectivamente. El ID_R% fue de (-5 ± 5) y el intervalo de confianza con un $\alpha=0,05$ ($t_{0.025,10}=2.228$) es $(-16.14; 6.14)\%$, dado que este intervalo incluye al cero, concluimos que el ID_R no es significativamente distinto de cero y en consecuencia no hay evidencias que indiquen que haya preferencia por alguno de los objetos. De la misma manera, para estudiar alguna posible preferencia del animal por explorar el objeto del lado izquierdo o del derecho se recalcularon los ID tomando como objeto “novedoso” al objeto de lado izquierdo. El ID_{izq}% calculado de este modo fue (5 ± 5) y el intervalo de confianza ($t_{0.025,10}=2.228$) IC: $(-6.14; 16.14)\%$ que nuevamente no es significativamente distinto de cero, por lo que se concluye que no se observaron preferencias por uno u otro lado de la arena experimental.

En conjunto, estos resultados indican que 15 minutos de entrenamiento inducen la formación de una MRO de largo término en la cepa CF1.

IV.1.2 NF-KB SE ACTIVA EN EL HIPOCAMPO DURANTE LA CONSOLIDACIÓN DE LA MRO

Tal como se indicó en la introducción, en trabajos previos de nuestro laboratorio se demostró que la activación de NF- κ B en el hipocampo es necesaria para la consolidación de la MRO (Federman et al., 2013). Sin embargo no hay antecedentes del momento en el cual tiene lugar esta activación luego del entrenamiento en este paradigma y este dato es clave para determinar si los tiempos de activación del factor de transcripción (FT) son congruentes con los tiempos de expresión esperados para los genes de respuesta inmediata, Zif268 y BDNF, que son los que deseamos estudiar en esta tesis. Basándonos en estudios previos que indican que el entrenamiento en paradigmas comportamentales del tipo Condicionamiento de Miedo Contextual y Evitación Inhibitoria inducen una activación transitoria de NF- κ B en el hipocampo a los 45 minutos luego del TR (Freudenthal et al., 2005; de la Fuente et al., 2014), decidimos estudiar si lo mismo ocurre luego de un entrenamiento NOR en ratones de la cepa CF1. Para ello se llevó a cabo un experimento diseñado tal como se indica en la figura IV.1.2i.

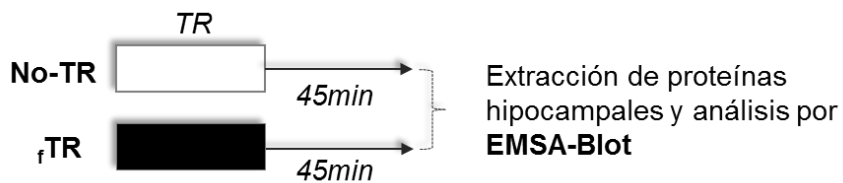


Figura IV.1.2i. Diseño experimental.

Mediante la técnica EMSA-Blot (sección III.5) se determinó la actividad de NF- κ B en extractos nucleares de tejido hipocampal y se calculó la actividad de NF- κ B del grupo fTR relativa a la de su grupo control No-TR al que no se le presentan objetos durante el entrenamiento (ver sección III.2B). En la figura IV.1.2ii se muestra a la izquierda un ejemplo representativo de la intensidad de las bandas de p65 (flechas) para el grupo No-TR y fTR (la doble banda indica que se revelaron dos dímeros posibles: p50/p65 y p65/p65), respectivamente, y a la derecha se muestra el gráfico con el resumen de los resultados. La actividad nuclear de NF- κ B es mayor en el grupo entrenado respecto al grupo control: ($Actrel_{No-TR}=1.00\pm 0.07$, $Actrel_{fTR}=1.4\pm 0.1$) ($t=2.419$, $p=0.027$), en particular, el aumento observado es del 40%.

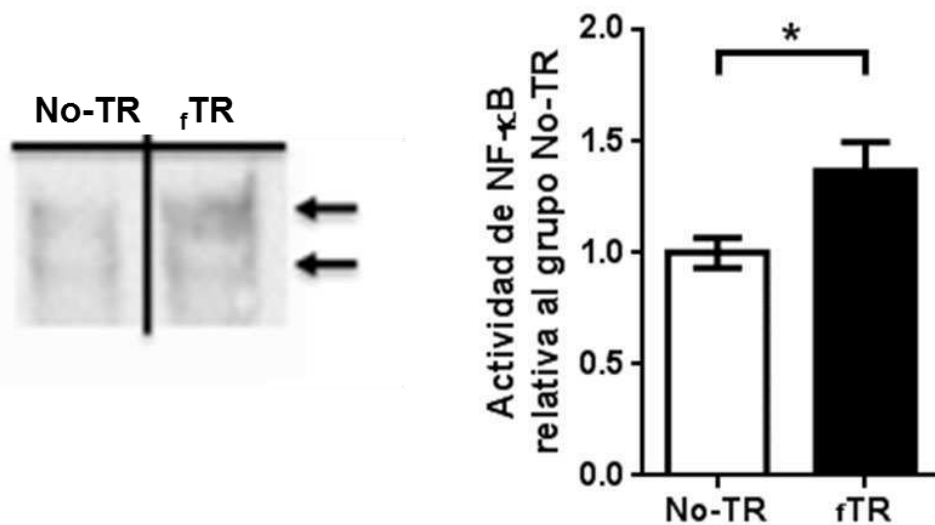


Figura IV.1.2.ii. La actividad de NF-κB aumenta 45 minutos luego de un entrenamiento fuerte en el paradigma NOR. A la izquierda se observa una imagen representativa de la intensidad de la marca observada para cada uno de los grupos. Las flechas indican que esas bandas son específicas para p65. El gráfico de la derecha muestra los valores de la actividad promedio de ambos grupos relativo al grupo no entrenado ($n_{No-TR}=9$, $n_{fTR}=10$). Los valores se expresan como promedio \pm error estándar y fueron comparados empleado la prueba t de Student. $P^*<0.05$.

Este resultado indica que la exploración de objetos novedosos durante el entrenamiento induce un aumento en la actividad nuclear de NF-κB en neuronas del hipocampo a los 45 minutos post- entrenamiento.

IV.1.3 LA ACTIVACIÓN DE NF-κB EN EL HIPOCAMPO ES NECESARIA PARA LA CONSOLIDACIÓN DE LA MRO

¿Qué pasa con la consolidación de la MRO si bloqueamos la actividad de NF-κB en el hipocampo luego del entrenamiento? La actividad transcripcional de NF-κB puede bloquearse administrando un oligonucleótido doble cadena denominado *Decoy*, que contiene la secuencia consenso para NF-κB y que por lo tanto se une al *sitio de unión al ADN* en NF-κB, bloqueándolo y evitando así la transcripción de los genes dependientes de este FT. Como control, se emplea el mismo oligonucleótido doble cadena con una mutación puntual en una de sus pares de base de manera tal que este oligo no se une a NF-κB. El oligonucleótido control se llama *Decoy mutado* (mDecoy). Ambos oligos han sido empleados en el laboratorio anteriormente y se ha probado su efectividad como inhibidor y su difusión hacia la región CA1 del hipocampo 15 minutos luego de su infusión (Freudenthal et al., 2005; Boccia et al., 2007; de la Fuente et al.,

2011; Federman et al., 2013). Para contestar nuestra pregunta, se evaluaron los niveles de retención de la MRO de largo término en animales que recibieron inyecciones intrahipocampales de *Decoy* o *mDecoy* inmediatamente luego del entrenamiento. El diseño llevado a cabo y el grafico con los resultados se indican a continuación (figura IV.I.3i).

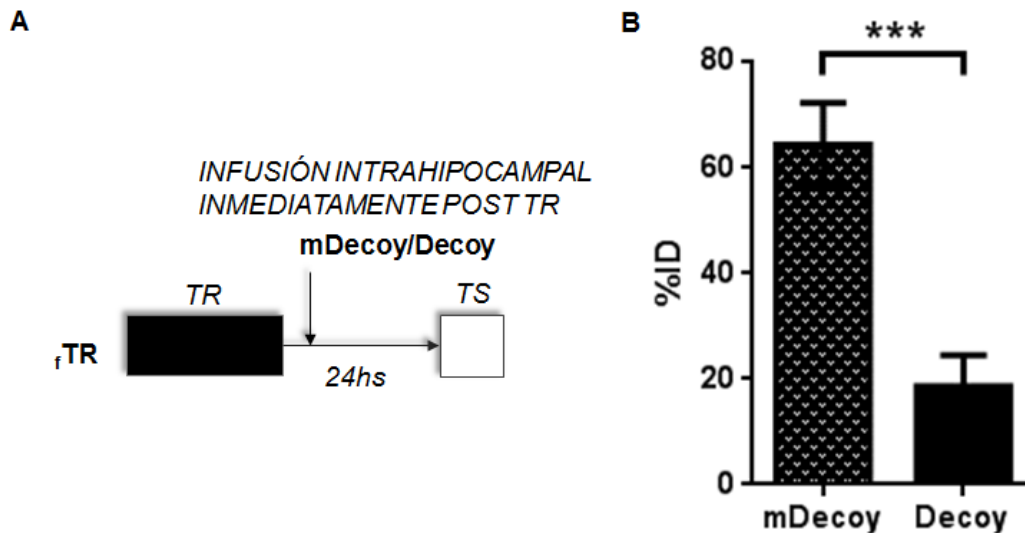


Figura IV.I.3i. A. Diseño experimental. **B** El grafico muestra el ID% promedio del grupo inyectado con la droga control *mDecoy* y del grupo inyectado con el inhibidor del actividad de *NF-κB*, *Decoy*. ($n_{mDecoy}=9$, $n_{Decoy}=9$). Los valores se expresan como promedio \pm error estándar y fueron comparados empleado la prueba *t* de Student. $P^{***}<0.0005$.

El tiempo de exploración para ambos grupos durante el testeó fue: $t_{mDecoy} = (33 \pm 3)s$ $t_{Decoy} = (30 \pm 3)s$ ($p=ns$) indicando que el tratamiento no afectó ni la motivación, ni la locomoción de los animales durante esta sesión. El ID% de los animales que recibieron la administración de *mDecoy* fue $(64 \pm 8)\%$ y el de los animales administrados con *Decoy* $(19 \pm 6)\%$, la diferencia entre ambos es significativa ($t=4.632$, $p=0.0003$), indicando que el tratamiento tuvo un efecto amnésico.

Por otro lado, decidimos estudiar si la administración de *Decoy* podría estar teniendo algún efecto sobre la translocación de *NF-κB* al núcleo, por lo que realizamos un segundo experimento similar al anterior, pero en este caso sacrificamos a los animales 45 minutos luego del entrenamiento, tiempo al que aumenta su actividad, y estudiamos si los niveles proteicos de *NF-κB* en el núcleo de neuronas provenientes de tejido hipocampal eran distintos entre animales tratados con *Decoy* o *mDecoy*. El diseño y el grafico con los resultados se indican en la figura IV.I.3ii.

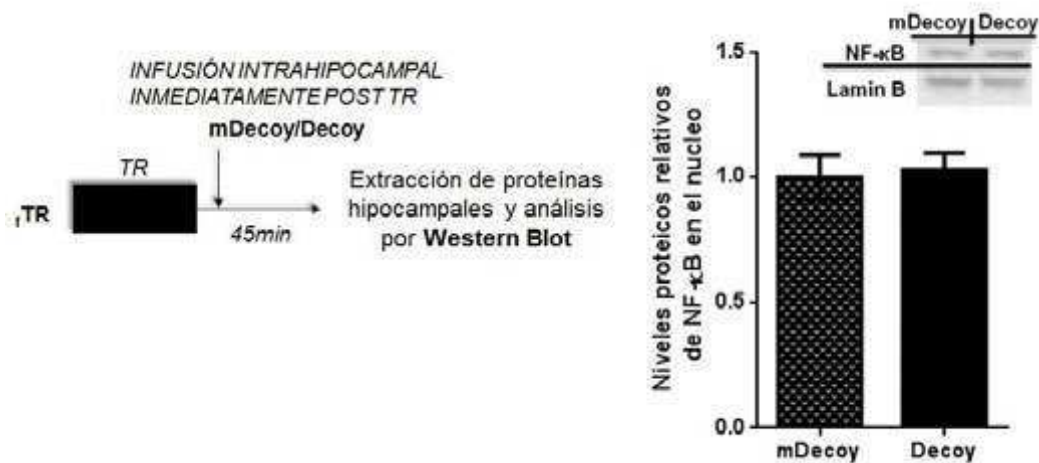


Figura IV.1.3ii. El diseño experimental se muestra a la izquierda. El grafico de la derecha muestra el ID% promedio del grupo inyectado con la droga control mDecoy y del grupo inyectado con el inhibidor de la actividad de NF-κB, Decoy. ($n_{mDecoy}=12$, $n_{Decoy}=13$). Los valores se expresan como promedio \pm error estándar y fueron comparados para buscar diferencias significativas empleado la prueba t de Student ($p=ns$).

No se observaron diferencias significativas en los niveles nucleares de NF-κB, No-TR=(1.00 ± 0.09), fTR=(1.03 ± 0.07), ($t=0.2628$, $p=ns$) lo que indica que la inyección de Decoy no afecta la translocación de NF-κB al núcleo.

Estos resultados indican que la activación de NF-κB es necesaria para la consolidación de la MRO y que la administración de Decoy no afecta la translocación de NF-κB al núcleo, por lo que estaría teniendo efecto exclusivamente sobre la actividad de unión al ADN de NF-κB.

IV.1.4 EXPRESIÓN PROTEICA DE BDNF Y ZIF268 EN EL HIPOCAMPO DURANTE LA CONSOLIDACIÓN DE LA MRO

Si la expresión de BDNF y ZIF268 se encuentra regulada por la activación de NF-κB, esperamos ver un aumento a tiempos que coincidan o sean mayores al tiempo de activación de dicho FT. Por otro lado, como se desea estudiar la relación entre NF-κB y la expresión de estas proteínas dentro de la ventana de consolidación de la MRO, se consideraron los antecedentes que indican que la expresión de proteínas en este proceso es necesaria hasta 6hs luego del entrenamiento (McGaugh, 1966b) y que la activación de NF-κB en otros paradigmas es transitoria y retorna a niveles basales a las 2hs del entrenamiento (Freudenthal et al., 2005). De este modo, decidimos medir los niveles proteicos de BDNF y Zif268 45min, 90 min y 3hs post-entrenamiento. El procedimiento llevado a cabo se indica a continuación (figura IV.1.4i.). Los niveles proteicos de BDNF se cuantificaron a partir de la fracción citosólica; los valores de

densidad óptica de cada una de las muestras se relativizaron al valor de densidad óptica de actina (control de siembra citosólico, ver sección III.4B). Los niveles proteicos del factor de transcripción Zif268 se cuantificaron de la fracción nuclear y la densidad óptica medida para cada muestra se relativizó a la de Lamin B (control de siembra nuclear, ver sección III.4B). Los resultados para ambas proteínas se muestran por separado.

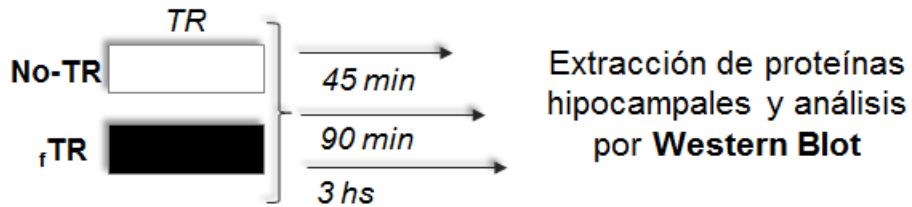


Figura IV.1.4i. Diseño experimental.

BDNF

Expresión a los 45 minutos post TR

La figura IV.1.4ii muestra un ejemplo representativo de las bandas reveladas para BDNF por Western Blot y el grafico conteniendo las medias \pm E.E. de los valores de densidad óptica relativa obtenidas del análisis de todos los datos. No se encontraron diferencias significativas en los niveles proteicos de BDNF del grupo \bar{f} TR relativos a los del grupo No-TR ($BDNF_{45min, No-TR} 1.0 \pm 0.1$, $BDNF_{45min, \bar{f}TR} 1.2 \pm 0.2$, $t=0.7944$, $p=ns$) lo que indica que el entrenamiento no indujo un cambio en la expresión proteica de BDNF a los 45 minutos.

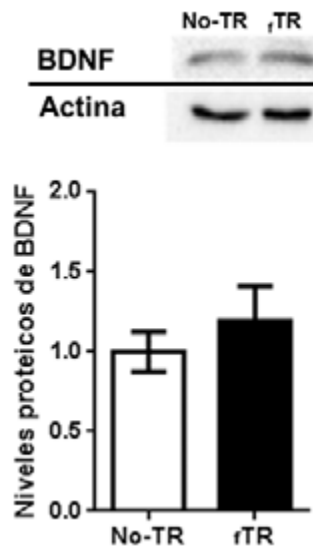


Figura IV.1.4.ii. Imagen con un ejemplo representativo de las bandas reveladas para cada grupo y gráfico mostrando los niveles proteicos de BDNF relativos al grupo No-TR. ($n_{No-TR}=12$, $n_{fTR}=10$).

Expresión a los 90 minutos post TR

No se encontraron diferencias significativas en los niveles proteicos de BDNF del grupo fTR relativos a los del grupo No-TR ($BDNF_{90min, No-TR} 1.0 \pm 0.2$, $BDNF_{90min, fTR} 1.3 \pm 0.3$, $t=0.8063$, $p=ns$) lo que indica que el entrenamiento tampoco indujo un cambio en la expresión proteica de BDNF a los 90 minutos (figura IV.1.4iii).

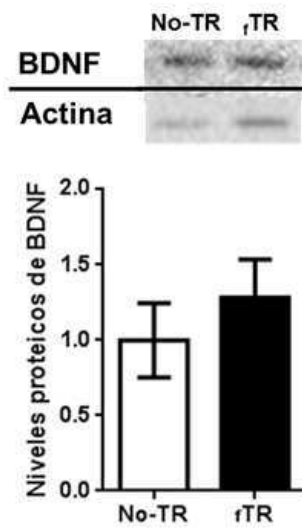


Figura IV.1.4iii La imagen muestra un ejemplo representativa de las bandas reveladas para cada grupo y el grafico muestra los niveles proteicos de BDNF relativos al grupo No-TR. ($n_{No-TR}=7$, $n_{fTR}=7$). Los valores se expresan como promedio \pm error estándar.

Expresión 3hs post TR

Los niveles proteicos de BDNF relativos al grupo control 3hs post entrenamiento fueron: $BDNF_{3hs, No-TR}=1.0\pm 0.2$, $BDNF_{3hs, fTR}=0.77\pm 0.06$. El análisis estadístico de estos resultados indica que las diferencias no son significativas ($t=1.458$, $p=ns$).

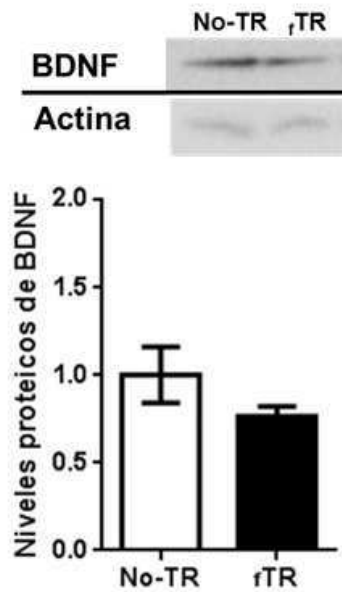


Figura IV.1.4.iv. La imagen muestra un ejemplo representativa de las bandas reveladas para cada grupo y el grafico muestra los niveles proteicos de BDNF relativos al grupo No-TR. ($n_{No-TR}=8$, $n_{rTR}=9$). Los valores se expresan como promedio \pm error estándar.

Estos resultados indican que no se observaron aumentos en la expresión de BDNF durante la consolidación de la memoria NOR en ninguno de los tiempos estudiados.

Zif268

Localización Nuclear

Para estudiar la localización nuclear de Zif268 se incubaron cortes hipocampales de animales no entrenados con el anticuerpo en cuestión. Para corroborar que la marca fuera específica, se realizó un control en el que los cortes fueron incubados con el anticuerpo pre-adsorbido al péptido de Zif268 y luego se comparó la marca revelada por ambas incubaciones (regular y pre-adsorbido). El péptido es un fragmento de la proteína Zif268 que corresponde al antígeno empleado para la producción del anticuerpo en cuestión. La pre-incubación del anticuerpo con su péptido satura los sitios de unión del primero y por ende disminuye la unión del anticuerpo a la proteína presente en el tejido hecho que se ve reflejado como una disminución de la marca fluorescente y que es indicativo de la marca específica contra la proteína de interés. La figura IV.1.4v muestra dos imágenes representativas de la fluorescencia original y la obtenida luego del tratamiento con el péptido, para marcar los núcleos se tiñeron los cortes con yoduro de propidio.

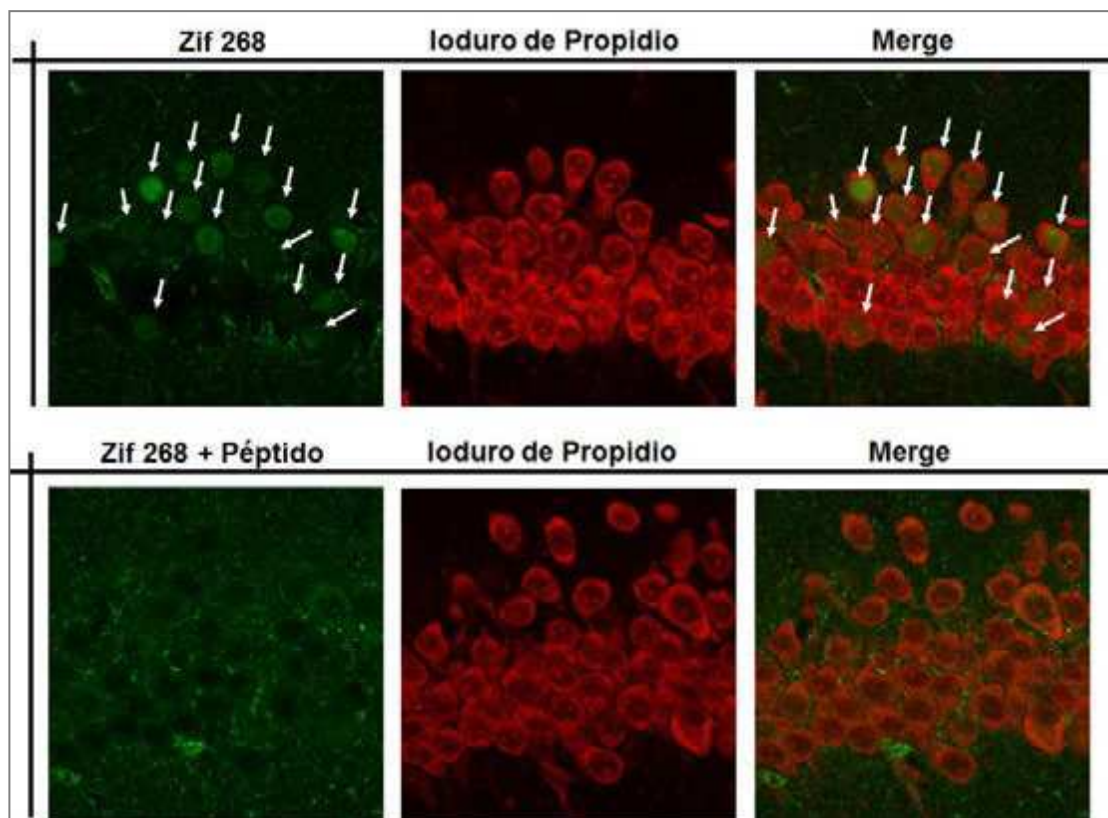


Figura IV.1.4.v. El anticuerpo para Zif268 reconoce la marca nuclear del FT. A la izquierda, en verde, se observa la marca de Zif268, al medio los núcleos marcados con ioduro de propidio y a la derecha la suma de ambas imágenes. Las flechas señalan núcleos conteniendo Zif268. Las imágenes inferiores muestran la fluorescencia registrada por el anticuerpo para Zif268 pre incubado con el péptido.

En la figura se observa que la marca del anticuerpo es nuclear (imágenes superiores) y que esta desaparece si el anticuerpo es pre-incubado con el péptido (imágenes inferiores), lo que indica que la marca nuclear revelada por el anticuerpo es específica de Zif268.

Expresión nuclear a los 45 minutos post TR

Se determinaron los niveles proteicos de Zif268 en la fracción nuclear de tejido hipocámpal. Los valores promedio respecto al grupo No-TR fueron: $ZIF268_{45min, No-TR}=1.0\pm 0.1$ y $ZIF268_{45min, fTR}=1.5\pm 0.2$ (figura IV.1.4vi, valores relativos al grupo control).

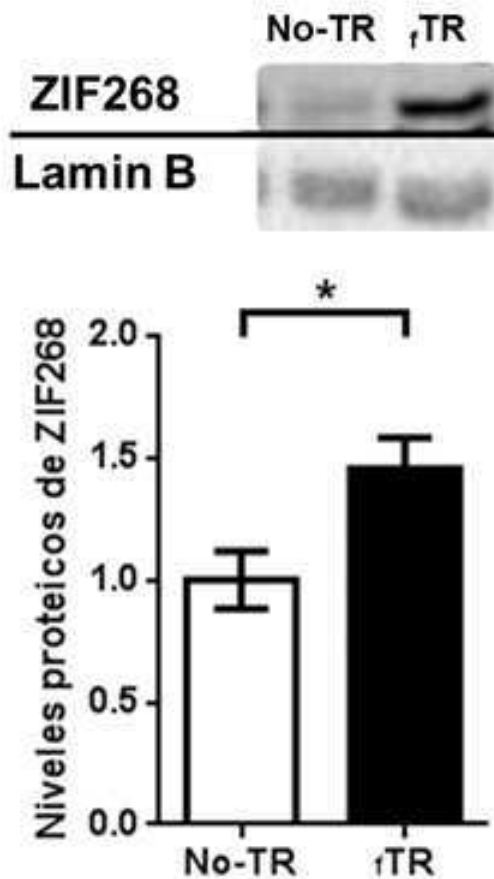


Figura IV.5.vii. El grafico muestra los niveles proteicos de ZIF268 a los 45 min post-entrenamiento relativos al grupo No-TR. ($n_{No-TR}=9$, $n_{fTR}=12$). Los valores se expresan como promedio \pm error estándar. $P^* < 0.05$.

La diferencia entre ambos es significativamente distinta ($t=2.529$, $p=0.0205$) e indica que a los 45 minutos post-entrenamiento el nivel proteico de Zif268 es en promedio un 50% mayor que en animales no entrenados.

Expresión a los 90 minutos post TR

Los niveles proteicos de ZIF268 del grupo fTR relativos a los del grupo No-TR fueron $ZIF268_{90min, No-TR} = 1.0 \pm 0.1$ y $ZIF268_{90min, fTR} = 1.1 \pm 0.2$. La diferencia entre ambos no es significativa ($t=0.3832$, $p=ns$), lo que indica que no se observa un aumento en los niveles proteicos de ZIF268 90 minutos post-TR (figura IV.1.4viii).

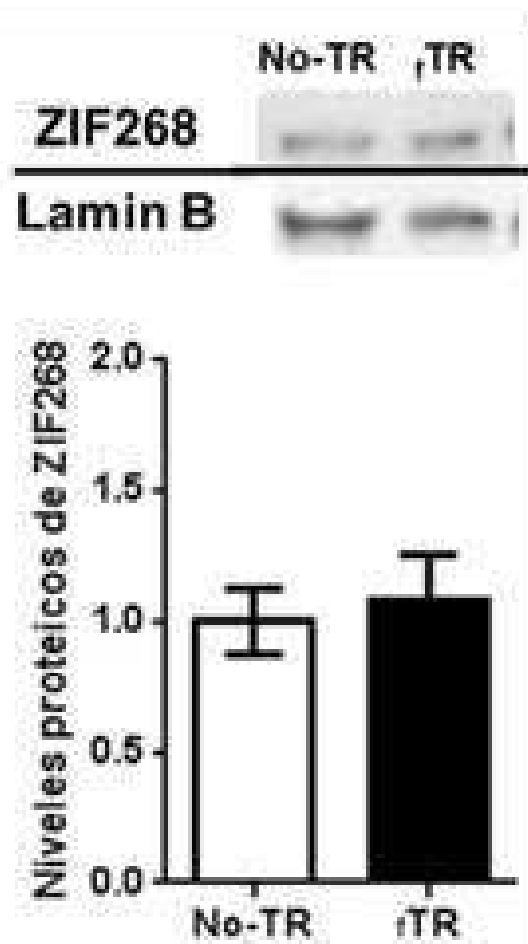


Figura IV.1.4viii. El grafico muestra los niveles proteicos a los 90 min post-entrenamiento de ZIF268 relativos al grupo No-TR. ($n_{No-TR}=9$, $n_{fTR}=8$). Los valores se expresan como promedio \pm error estándar.

Expresión 3hs post TR

Los niveles proteicos de ZIF268 del grupo fTR relativos a los del grupo No-TR fueron $ZIF268_{3hs, No-TR}=1.0\pm 0.1$ y $ZIF268_{3hs, fTR}=1.1\pm 0.2$. Nuevamente, la diferencia entre ambos es no significativa ($t=0.3869$, $p=ns$), lo que indica que no se observa un aumento en los niveles proteicos de ZIF268 3hs post-TR (figura IV.1.4ix).

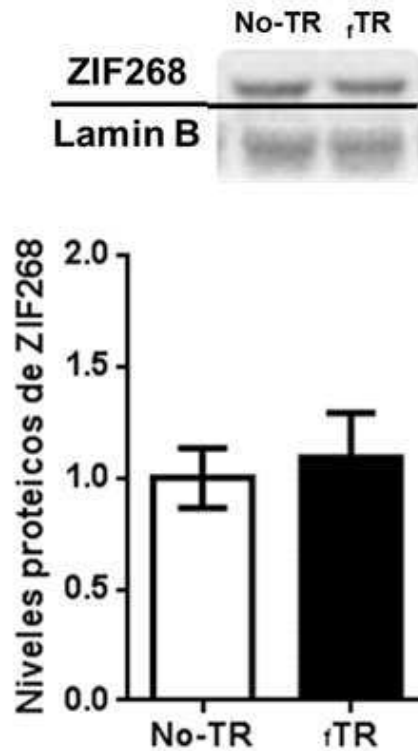


Figura IV.1.4ix. El grafico muestra los niveles proteicos a las 3 h post-entrenamiento de ZIF268 relativos al grupo No-TR. ($n_{No-TR}=9$, $n_{iTR}=7$). Los valores se expresan como promedio \pm error estándar.

En conjunto, estos resultados indican que el entrenamiento indujo un aumento a 45 minutos post-TR, concordando temporalmente con la activación de NF- κ B, y que este aumento es transitorio ya que a los 90 minutos retorna a los niveles basales.

Nuestro objetivo principal en esta parte de la Tesis fue estudiar si la activación de NF- κ B regula la expresión de los genes BDNF y ZIF268 durante la consolidación de la MRO. Al no haber observado un cambio en los niveles de la proteína BDNF en la ventana temporal estudiada, se decidió no continuar con el estudio de este gen y se continuó el análisis con ZIF268.

IV.1.5 LA EXPRESIÓN DE ZIF268 EN EL HIPOCAMPO ES NECESARIA PARA LA CONSOLIDACIÓN DE LA MRO

Habiendo visto que la exposición a los objetos durante el entrenamiento indujo un aumento en la expresión de ZIF268, la siguiente pregunta es si este aumento es necesario para la consolidación de la MRO. Para responderla, es necesario bloquear la expresión de ZIF268 y ver su efecto comportamental, de forma similar a lo realizado en el punto IV.1.3i con NF- κ B. Para bloquear la expresión de ZIF268 empleamos un oligonucleótido de ADN de simple cadena que es complementario al ARNm de ZIF268 (oligonucleótido complementario, OC) y por lo tanto se une a éste bloqueando su traducción a proteína. Además puede inducir la degradación del ARNm mediante la

acción de la RNAsa H que reconoce duplas ADN-ARN y las degrada. Como control del tratamiento se empleó un oligonucleótido que posee las mismas bases que el OC ordenadas en forma aleatoria. Este oligo control se denomina oligo aleatorio, OA. La estrategia de bloqueo utilizando estos oligos ya había sido empleada exitosamente en ratas (Katche et al., 2012b). El diseño del experimento se indica en la figura IV.I.5i.

INFUSIÓN INTRAHIPOCAMPAL INMEDIATAMENTE POST TR
Oligo complementario (OC)/ Oligo aleatorio (OA)/ Vehículo (Veh)

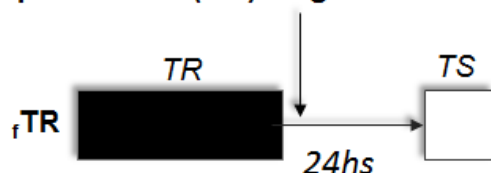


Figura IV.I.5i. Diseño experimental.

Tal como se observa en el diseño anterior, en el experimento se incluyó un tercer grupo administrado con *vehículo*, que es el diluyente empleado para disolver los oligonucleótidos y que en nuestro caso fue *solución salina*. Este grupo control se emplea para asegurarse que el oligonucleótido aleatorio no este teniendo algún efecto inespecífico en el comportamiento exploratorio del animal (efecto sobre el tiempo de exploración total durante el testeo) o sobre la retención de la MRO (efecto en el ID%).

En ratas, la concentración empleada es de 2nmol/ μ l, pero dado que el cerebro del ratón tiene menor tamaño que el de rata y que toda droga puede ser tóxica a altas dosis, se decidió administrar una dosis menor. En primer lugar, probamos con una dosis de 0.4nmol/ μ l, inyectando 1 μ l bilateral en el hipocampo. El ID% para los distintos grupos fue: ID_{Veh} = (44 \pm 8)%, ID_{OA} = (53 \pm 11)%, ID_{OC} = (43 \pm 6)%. El análisis estadístico indica que las diferencias no son significativas (ANOVA de un factor, $F_{2, 19} = 0.4460$, $p = ns$). Los resultados se indican en el grafico IV.I.5ii.

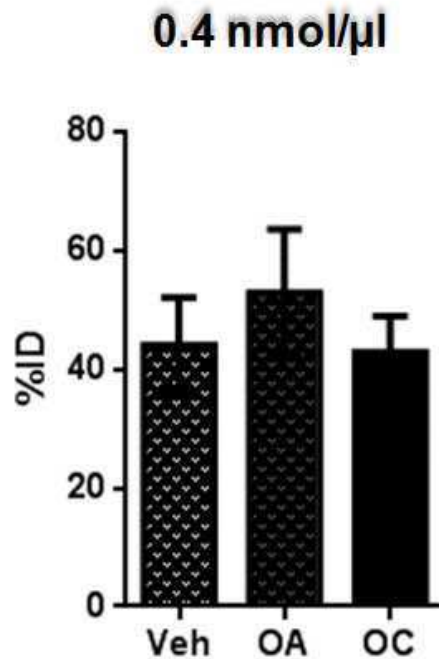


Figura IV.I.5ii. El gráfico muestra el ID% para los grupos inyectados con vehículo (Veh), o 0.4nmol/lado de oligo aleatorio (OA) u oligo complementario (OC), respectivamente ($n_{veh}=6$, $n_{OA}=7$, $n_{OC}=9$). El ANOVA a un factor no dio significativo.

El tiempo de exploración de cada grupo durante la sesión de testeo fue $t_{veh} = (27 \pm 6)$ s, $t_{OA} = (33 \pm 4)$ s $t_{OC} = (23 \pm 3)$ s ($p=ns$). Estos resultados indican que la administración de OC a la dosis empleada no tuvo efecto sobre la consolidación de la MRO y que ni el OA ni el OC tuvieron efectos inespecíficos sobre el comportamiento exploratorio del animal. Es probable que la dosis empleada en este experimento no fuera suficiente para bloquear la expresión de ZIF268 o para producir un efecto a nivel comportamental, por lo que se repitió el experimento usando una dosis mayor de oligonucleótido, en particular, 1nmol/lado. A continuación, se muestran los resultados (figura IV.I.5iii).

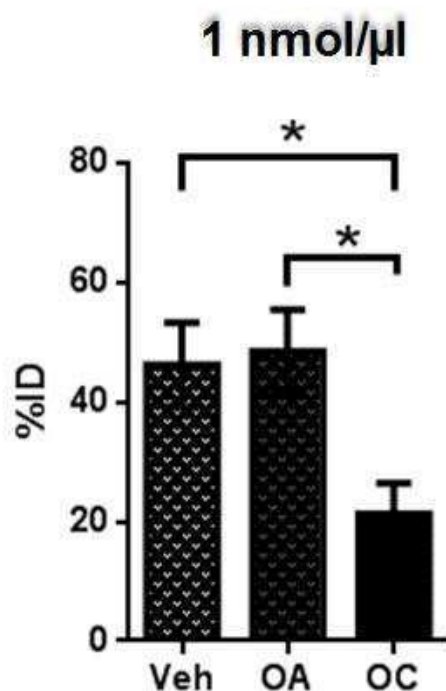


Figura IV.I.5iii. El grafico muestra el ID% para los grupos inyectados con vehículo (Veh), o 1nmol/lado de oligo aleatorio (OA) u oligo complementario (OC), respectivamente ($n_{veh}=11$, $n_{OA}=9$, $n_{OC}=13$). ANOVA de un factor, $P^* < 0.05$.

El ID% para cada grupo fue: $ID_{Veh} = (46 \pm 7)\%$, $ID_{OA} = (48 \pm 7) \%$ $ID_{OC} = (21 \pm 5) \%$. Las diferencias entre grupos fueron significativamente distintas (ANOVA de un factor, $F_{2,30} = 6.103$, $p = 0.006$). La comparación post-hoc indica que el ID% del grupo OC es significativamente distinto al grupo vehículo y al grupo OA y que los grupos Veh y OA no son significativamente distintos entre sí. El tiempo de exploración total durante el testeo para cada grupo fue: $t_{Veh} = (22 \pm 3)s$, $t_{OA} = (24 \pm 3)s$, $t_{OC} = (24 \pm 3) s$ ($p = ns$).

Estos resultados indican que el tratamiento con 1nmol/lado de oligo complementario tuvo un efecto amnésico sobre la retención de la memoria y que éste es específico para la secuencia empleada ya que el OA no afecto la retención de la MRO. Además no se observaron efectos en el comportamiento exploratorio de los animales como consecuencia del tratamiento con el OA y/o el OC.

Por último, dado que no hay antecedentes del uso de esta droga en ratones, se corroboró que el OC administrado a la dosis de 1nmol/lado estuviera bloqueando el aumento en la expresión de ZIF268 observado 45 minutos post-entrenamiento. Para ello, se entrenaron los ratones al paradigma NOR e inmediatamente post-entrenamiento a un grupo se le administro OC y a otro OA. Luego de 45 minutos los animales se sacrificaron y se analizaron los niveles proteicos de ZIF268 en el núcleo de neuronas de tejido hipocampal (ver figura IV.I.5iv)

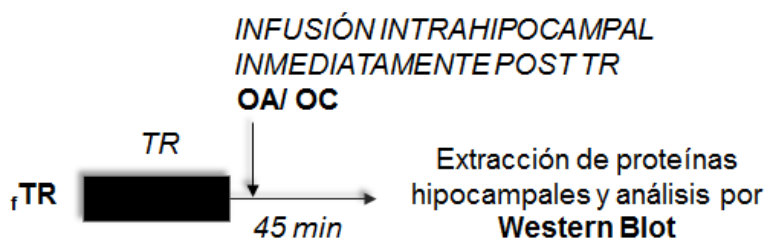


Figura IV.1.5iv. Diseño experimental

Nótese que esta vez, no fue necesario incluir un grupo *vehículo* ya que no se espera que el OA tenga un efecto sobre la expresión proteica de ZIF268 lo que lo convierte en un control suficiente y adecuado para el objetivo (o la comparación) en cuestión. El análisis de los niveles proteicos de ZIF268 luego de la administración de los oligos indica que los niveles proteicos de ambos relativizados al nivel del grupo OA son: OA = (1.00 ± 0.08) y OC = (0.76 ± 0.06) (figura IV.1.5.v).

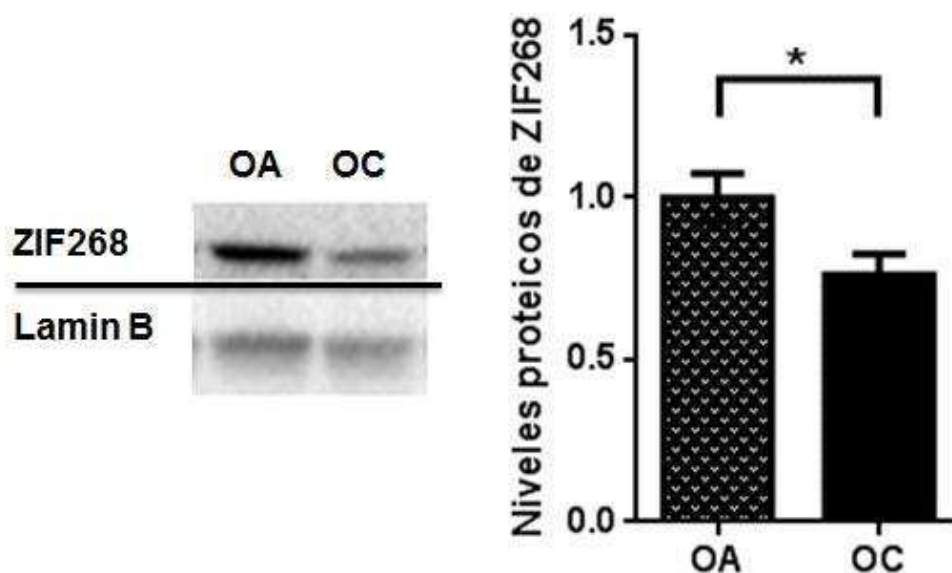


Figura IV.1.5.v. A la derecha se muestra un ejemplo representativo de la intensidad de las bandas para cada grupo. El gráfico de la izquierda muestra los niveles promedio de ZIF268 relativos al nivel del grupo OA. Los grupos recibieron tratamiento intra-hipocampal con 1nmol de oligo (OA u OC) por hipocampo (bilateral) ($n_{OA}=18$, $n_{OC}=14$). $P^* < 0.05$.

La diferencia es estadísticamente significativa ($t=2.312$, $p= 0.0278$) e indica que la administración de OC indujo una disminución de 24% en los niveles proteicos de ZIF268, respecto al grupo inyectado con OA.

En conjunto, estos resultados indican que la administración intra-hipocampal y bilateral de 1nmol de OC inmediatamente post-entrenamiento disminuye los niveles proteicos de ZIF268 y afecta la consolidación de la memoria NOR.

IV.6 LA EXPRESIÓN DE ZIF268 DURANTE LA CONSOLIDACIÓN DE LA MRO ES DEPENDIENTE DE LA ACTIVACIÓN DE NF-κB.

Habiendo encontrado un aumento en la expresión de ZIF268 durante la consolidación de la MRO, nos interesa estudiar si este aumento es dependiente de la activación de NF-κB. La idea detrás de este experimento es que si NF-κB regula la transcripción del gen durante la consolidación, al haber cambios en su ARNm, su expresión proteica también se verá afectada. Esta suposición es válida en este caso particular en el que nos encontramos trabajando con un *gen de respuesta temprana* del que se espera que sea transcrito y traducido rápidamente para cumplir con su rol de *gen efector*.

Para cumplir con nuestro objetivo particular, entrenamos animales canulados e inmediatamente post-entrenamiento bloqueamos la activación de NF-κB en el hipocampo mediante la administración local de *Decoy*. A los 45 minutos del entrenamiento sacrificamos los animales y medimos los niveles proteicos de ZIF268 comparándolos con los niveles del grupo control inyectados con *mDecoy* (ver figura IV.I.6i).

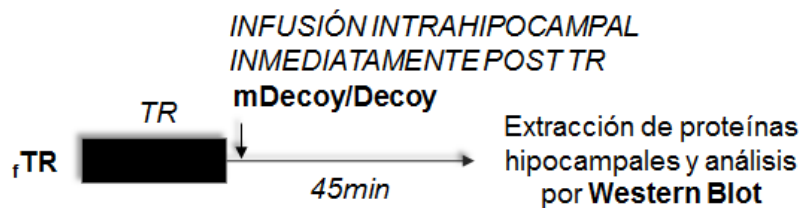


Figura IV.I.6.i. Diseño experimental

Los niveles proteicos de ZIF268 en ambos grupos fueron: *mDecoy*: (1.00 ±0.2) y *Decoy* = (0.62 ±0.06) y la diferencia entre ambos es estadísticamente significativa (Prueba t corregida por Welch para varianzas no equivalentes, $t= 2.258$, $p= 0.0397$, figura IV.I.6ii). Este resultado indica que la expresión proteica de ZIF268 durante la consolidación de la MRO es dependiente de la activación de NF-κB.

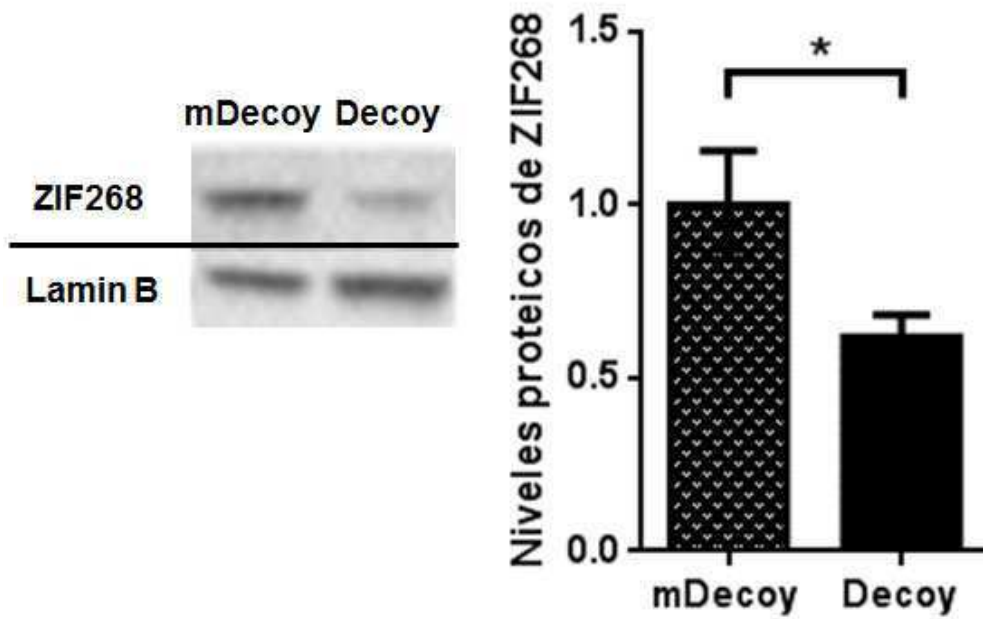


Figura IV.I.6ii. El grafico muestra los niveles proteicos de ZIF268 relativos al nivel del grupo mDecoy ($n_{mDecoy}=12$, $n_{Decoy}=13$). $P^* < 0.05$.

Este resultado indica que NF- κ B regula la expresi3n proteica de ZIF268 durante la consolidaci3n de la MRO.

PARTE II

IV.II.1 ROL DE CaMKII δ DURANTE LA CONSOLIDACIÓN DE LA MRO.

En un trabajo previo a esta tesis se determinó que, en ratones C57, 15 minutos de entrenamiento en el paradigma NOR llevan a la formación de una memoria de largo término persistente (pMLT - que persiste hasta 7 días). Además se observó que este protocolo de entrenamiento induce la unión de NF- κ B al promotor de CaMKII δ 1h post-entrenamiento y un aumento en la expresión de este gen a las 3hs post-entrenamiento, durante la ventana de consolidación de la MRO (Federman et al., 2013). Con el objeto de estudiar si esta expresión de CaMKII δ es necesaria para la formación de la MLT, nos propusimos bloquear el aumento en su ARNm durante la consolidación y evaluar los efectos sobre la retención de la MLT a 24hs. Para disminuir los niveles de ARNm, se diseñó especialmente un oligonucleótido complementario al ARNm de CaMKII δ que, tal como se indicó anteriormente, se une al ARNm e induce su degradación vía la RNasa H. El oligonucleótido complementario se diseñó siguiendo las recomendaciones sugeridas en el manual de *Integrated DNA Technologies* (IDT, 2011), tal como se indica en materiales y métodos, y se verificó que su complementariedad fuese total (100% de complementariedad entre bases) y específica para CaMKII δ y no para otro ARNm. Luego, para el diseño del OA se re-organizaron las bases de manera aleatoria, pero procurando que no fuera complementaria a otro ARNm, de manera tal que el oligo resultante no afectara los niveles de ARNm de ninguna otra proteína. Los análisis de especificidad de los oligos diseñados se realizaron empleando la herramienta online *Nucleotide BLAST*[®] (blastn, NCBI, NIH) y se incluyen en el apéndice (sección VII.2). Los oligonucleótidos empleados se encuentran fosforotiolados en sus primeras y últimas tres bases. Esta modificación hace que estos enlaces nucleotídicos, que comúnmente son fosfodiéster, sean reemplazados por enlaces fosforo-tiolados lo que evita su degradación por DNAsas.

De este modo, el primer experimento se llevó a cabo con el objeto de determinar si la inyección de este oligonucleótido disminuye efectivamente los niveles de ARNm de CaMKII δ observados luego del entrenamiento.

IV.II.1A Disminución de los niveles de ARNm de CaMKII δ luego de la infusión intra-hipocampal de oligonucleótidos complementarios.

El experimento llevado a cabo se muestra en la figura IV.II.1i.

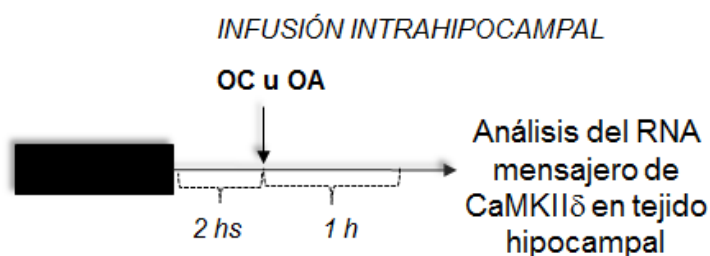


Figura IV.II.1i. Diseño experimental.

Los animales fueron entrenados con un protocolo fuerte, de 15 minutos, y 2hs mas tarde la mitad de los animales recibió una infusión bilateral intrahipocámpal del oligonucleótido complementario (OC) y la otra mitad del oligonucleótido aleatorio (OA). El tiempo de inyección fue elegido basado en el antecedente con ZIF268, en el que se observó que a 45 minutos post-inyección el efecto del oligonucleótido ya era visible, por lo que se supuso que la inyección a las 2hs post-TR disminuiría los niveles de ARNm a las 3hs post-TR. De este modo, los animales fueron sacrificados 1h luego de la inyección, es decir 3hs post-entrenamiento, tiempo que coincide con el aumento de ARNm observado en el trabajo previo (Federman et al., 2013). Las muestras de ARNm fueron analizadas por PCR en tiempo real (sección III.6C). Los ARNm promedio para ambos grupos relativos al grupo OA fueron: OA = (1.0±0.1) y OC = (0.69±0.08), la diferencia entre ambos es significativamente distinta ($t= 2.176$, $p=0.0375$, figura IV.II.1ii).

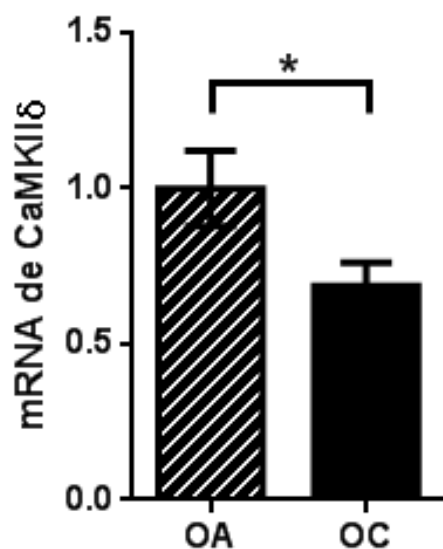


Figura IV.II.1ii. El gráfico muestra el ARNm de los grupos tratados con OA y OC para CaMKIIδ relativos al grupo OA ($n_{OA}=16$, $n_{OC}=16$). $P^*<0.05$.

Estos resultados indican que la administración del oligonucleótido complementario al ARNm de CaMKII δ indujo una disminución del 31% en su ARNm, 3 hs post-TR respecto al grupo control.

IV.II.1B Efecto Comportamental de la Inhibición de la expresión del gen de CaMKII δ durante la Consolidación de la MRO.

Los animales fueron entrenados al paradigma NOR y 2hs luego del entrenamiento se les administró OC a CaMKII δ u OA intra-hipocampalmente. Luego, se evaluó la retención de la memoria a las 24hs (figura IV.II.1iii).

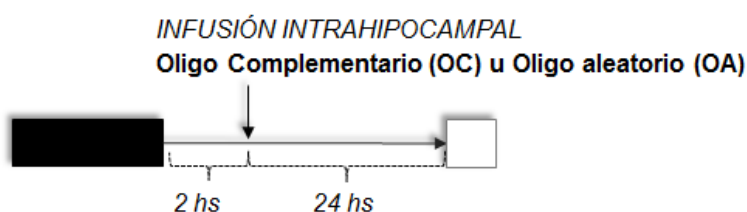


Figura IV.II.1iii. Diseño experimental

A diferencia de los experimentos realizados con OC para ZIF268 (sección IV.I.5), en este caso, no se incluyó el grupo *vehículo* ya que, basándonos en los resultados con ZIF268, se consideró que la administración de 1nmol/lado de oligo control no genera efectos inespecíficos sobre la retención, locomoción y/o motivación del animal.

El ID% para cada grupo fue: ID_{OA} = (23 \pm 6)% e ID_{OC} = (26 \pm 6)% (figura IV.II.1iv) y el tiempo total de exploración t_{OA} = (4.4 \pm 0.5)s y t_{OC} = (3.6 \pm 0.4)s (p=ns). La diferencia en los ID% de ambos grupos no es estadísticamente significativa (t = 0.3094, p=ns). Este resultado indica que disminuir el ARNm de CaMKII δ durante la consolidación de la MRO no afecta la formación de la memoria de largo término.

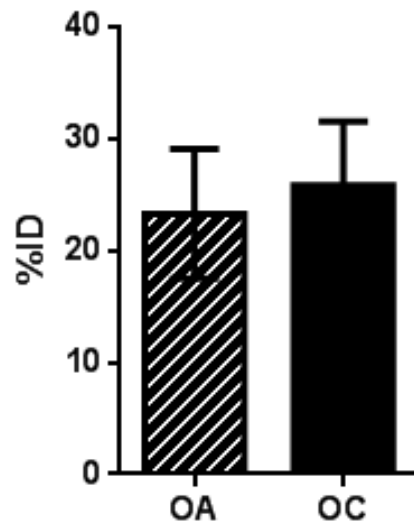


Figura IV.II.1.iv. El grafico muestra el ID% de los grupos tratados con OA y OC para CaMKII δ , respectivamente 24hs post-TR ($n_{OA}=9$, $n_{OC}=11$). $p=ns$.

En base a este resultado, hipotetizamos que CaMKII δ podría estar afectando la persistencia de la memoria en formación. Para estudiar si CaMKII δ tiene un efecto específico sobre la formación de una pMLT y no sobre la de una MLT, se realizó un experimento similar al anterior, pero esta vez se evaluó la retención 7 días luego del entrenamiento. El diseño se indica a continuación (figura IV.II.1v).

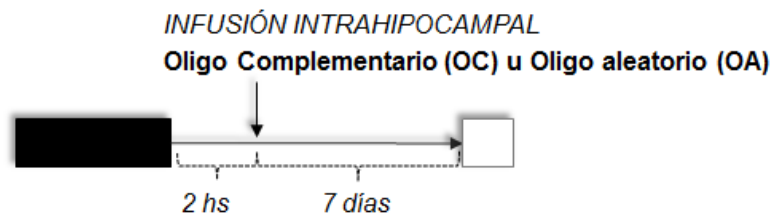


Figura IV.II.1.v. Diseño experimental

El ID% durante el testeo fue $ID_{OA} = (23 \pm 3)\%$ e $ID_{OC} = (7 \pm 2)\%$, la diferencia entre ambos es significativamente distinta ($t=4.472$, $p=0.0004$) (figura IV.II.1vi). Por otro lado, el tiempo total de exploración fue similar entre grupos: $t_{OA} = (5.7 \pm 0.5)s$ y $t_{OC} = (5.8 \pm 0.4)s$ ($p=ns$). Estos resultados indican que el tratamiento con OC tuvo un efecto amnésico sobre la pMLT y que este efecto se debe a un déficit cognitivo y no a un efecto sobre el comportamiento exploratorio del animal.

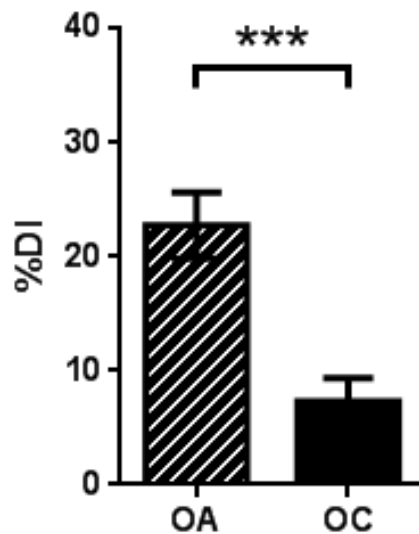


Figura IV.II.1.vi. El gráfico muestra el ID% de los grupos tratados con OA y OC para CaMKII δ , respectivamente ($n_{OA}=7$, $n_{OC}=10$). $p^{***}<0.0005$.

Estos resultados indican que la expresión del gen de CaMKII δ durante la consolidación de la MRO tiene un efecto sobre la formación de la pMLT, sin afectar la formación de la MLT que se expresa a las 24hs del entrenamiento.

IV.II.2 EXPRESIÓN DE CAMKII δ A DISTINTOS DÍAS LUEGO DEL ENTRENAMIENTO

Los resultados del punto IV.II.1 indican que CaMKII δ participa de la formación de una memoria persistente, pero para que esta memoria persista en el tiempo y pueda ser evocada a 7 días de su adquisición deben haber mecanismos que mantengan activa la traza original aún fuera de la ventana de consolidación (sección I.8). ¿Podría CaMKII δ estar participando de este proceso? Para responder esta pregunta en primer lugar decidimos investigar si su expresión se mantiene activa fuera de la ventana de consolidación, por ejemplo, 24hs luego del entrenamiento. Además, decidimos incluir un grupo control que fuera entrenado un tiempo suficiente como para formar una MLT pero no una pMLT.

En primer lugar probamos si un protocolo de entrenamiento de 10 min (grupo TR) y uno de 15 min (grupo \bar{r} TR) permite inducir una MLT y una pMLT, respectivamente. Los

tiempos 10 min y 15 min fueron elegidos basándonos en el resultado previo de (Federman et al., 2013), donde se había corroborado que en esta cepa 3 min de entrenamiento no son suficientes para generar una MLT (pero sí una MCT), 10 min inducen una MLT y 15 min inducen una pMLT. En esta Tesis, repetimos este experimento pero decidimos utilizar un grupo control no entrenado (grupo No-TR) en lugar de un grupo entrenado 3 min para contrastar nuestros resultados con los de un animal que no haya tenido ninguna experiencia con los objetos. El diseño de los experimentos se indica a continuación (figura IV.II.2i):

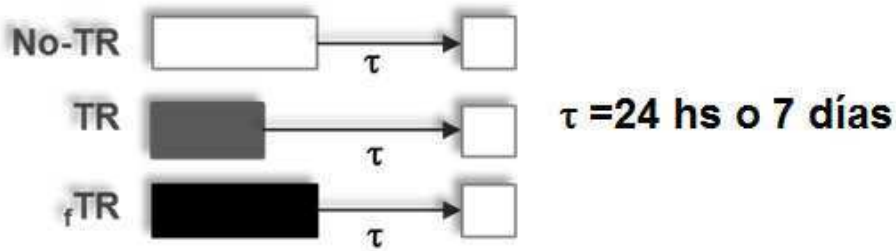


Figura IV.II.2i. Diseño experimental

Evaluación a 24hs: formación de una MLT

El ID% a 24hs para los distintos grupos fue: $ID_{\text{No-TR}} = (-1 \pm 6)\%$, $ID_{\text{TR}} = (37 \pm 9)\%$ e $ID_{\text{fTR}} = (42 \pm 9)\%$. Las diferencias entre los grupos fueron analizadas por un ANOVA a un factor y dado que se encontraron diferencias significativas ($F_{2,22}=8.410$, $p=0.0019$) se realizó una comparación post-hoc (prueba Duncan) que indica que los ID% de los grupos TR y fTR son significativamente distintos a los del grupo No-TR. El tiempo de exploración total durante el TS para cada grupo fue: $t_{\text{No-TR}} = (8.6 \pm 0.9)\text{s}$, $t_{\text{TR}} = (6.9 \pm 0.7)\text{s}$ y $t_{\text{fTR}} = (6 \pm 1)\text{s}$ ($F_{2,22}= 1.69$, $p=\text{ns}$). El grafico que resume estos resultados se muestra a continuación (figura IV.II.3ii):

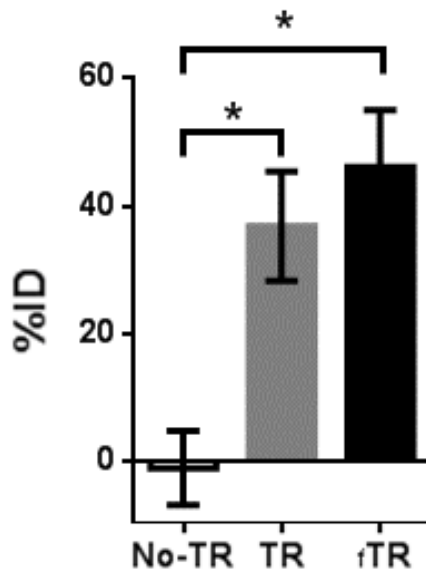


Figura IV.II.3ii. El grafico muestra el ID% del grupo no entrenado (No-TR) y entrenados 10 o 15 minutos, (grupo TR y fTR, respectivamente) ($n_{No-TR}=8$, $n_{TR}=9$ y $n_{fTR}=8$). $P^*<0.05$.

Este resultado indica que 10 y 15 minutos de entrenamiento inducen la formación de una memoria de largo término en ratones C57.

Evaluación a 7 días: formación de una pMLT

El ID% a 7 días para los distintos grupos fue: $ID_{No-TR} = (-1 \pm 6)\%$, $ID_{TR} = (14 \pm 5)\%$ e $ID_{fTR} = (29 \pm 6)\%$, el ANOVA de un factor dió significativo ($F_{2,23}=8.191$, $p=0.0021$) y la comparación post-hoc (prueba de Duncan) indica que el ID% del fTR es significativamente distinto al del grupo No-TR mientras que no son significativas las diferencias entre el grupo No-TR y el grupo TR, ni entre el grupo TR y el grupo fTR. El tiempo de exploración total durante el TS para cada grupo fue: $t_{No-TR} = (7.3 \pm 0.7)s$, $t_{TR} = (6.5 \pm 0.5)s$ y $t_{fTR} = (6.9 \pm 0.6)s$ ($F_{2,23}= 0.39$, $p=ns$). A continuación se muestra el grafico (figura IV.II.3iii):

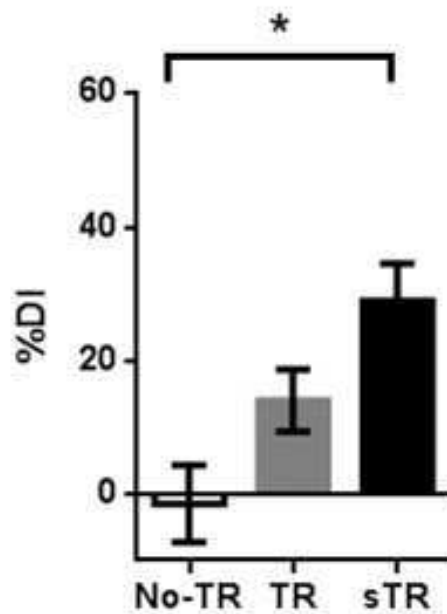


Figura IV.II.3iii. El grafico muestra el ID% del grupo no entrenado (No-TR) y entrenados 10 o 15 minutos, (grupo TR y fTR, respectivamente) ($n_{No-TR}=9$, $n_{TR}=8$ y $n_{fTR}=9$). $P^* < 0.05$.

Este resultado indica que sólo el protocolo fTR induce la formación de una MLT persistente.

A continuación, en base a los resultados anteriores nos formulamos las siguiente preguntas ¿Cambia la expresión de CaMKII δ durante el mantenimiento de la MLT? ¿Se observan diferencias en su expresión entre animales entrenados con un protocolo estándar y un protocolo fuerte?

Para responder estas preguntas se llevó a cabo un experimento similar al de la figura IV.II.2i, pero esta vez en lugar de testear los animales, se los sacrificó 24hs y 7 días post-entrenamiento y se midieron los niveles de ARNm en los tres grupos para compararlos entre sí (figura IV.II.3iv)

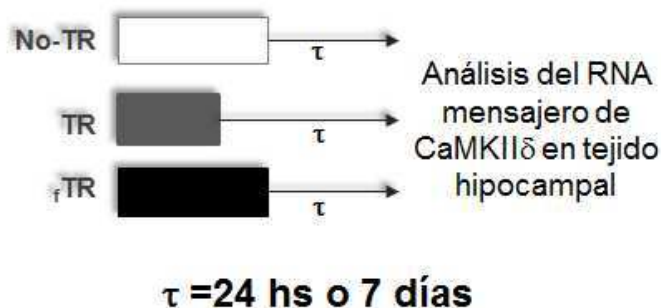


Figura IV.II.3iv. Diseño experimental

Niveles de ARNm de CaMKII δ 24hs luego del entrenamiento

Los valores promedio de ARNm fueron relativizados al del grupo No-TR, $ARNm_{No-TR} = (1.0 \pm 0.2)$, $ARNm_{TR} = (3.3 \pm 0.7)\%$ y $ARNm_{fTR} = (3 \pm 1)$. Las diferencias son significativamente distintas ($F_{2,16} = 3.96$, $p = 0.0401$). La comparación *post-hoc* (Duncan) indica que el ARNm para los grupos TR y fTR es significativamente mayor al del grupo No-TR (figura IV.II.3v).

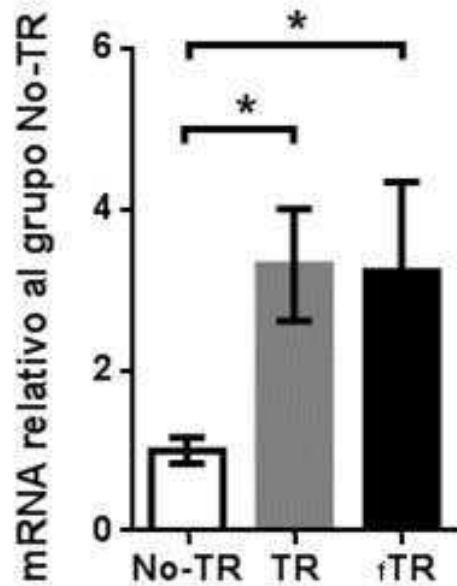


Figura IV.II.3v. Valores de ARNm de los tres grupos relativos al grupo No-TR ($n_{No-TR} = 7$, $n_{TR} = 7$ y $n_{fTR} = 5$). $p^* < 0.05$.

Este resultado indica que el ARNm de CaMKII δ aumenta 24hs post-entrenamiento. Este aumento se encuentra fuera de la ventana de consolidación de la MLT, dentro del periodo asociado al mantenimiento de la traza mnésica.

Niveles de ARNm de CaMKII δ 7 días luego del entrenamiento

Los valores promedio de ARNm a los 7 días del entrenamiento fueron relativizados al del grupo No-TR $ARNm_{No-TR} = (1.0 \pm 0.2)$, $ARNm_{TR} = (2.9 \pm 0.5)\%$ y $ARNm_{fTR} = (4 \pm 1)$. Las diferencias son significativas ($F_{2,11} = 4.152$, $p = 0.0454$). La comparación *post-hoc* (prueba de Duncan) indica que los niveles de ARNm del grupo fTR son significativamente mayores a los del grupo No-TR y no son significativas las diferencias entre el grupo No-TR y el grupo TR, ni entre el grupo TR y el grupo fTR. (figura IV.II.3vi).

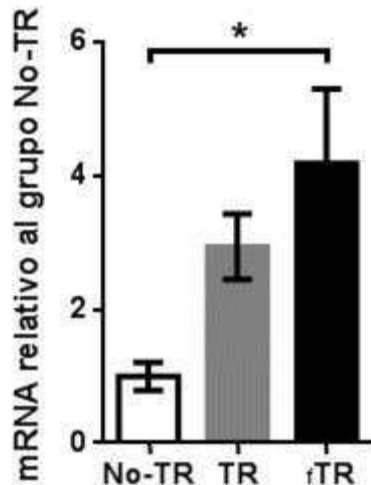


Figura IV.II.3vi. Valores de ARNm de los tres grupos relativos al grupo No-TR ($n_{\text{No-TR}}=4$, $n_{\text{TR}}=5$ y $n_{\text{fTR}}=5$). $p^* < 0.05$.

Sólo el protocolo de entrenamiento fuerte induce un aumento significativo del ARNm de CaMKII δ en relación al grupo No-TR.

Los resultados anteriores indican que el entrenamiento induce un aumento en la expresión del gen CaMKII δ aún fuera de la ventana de consolidación de la MRO. Este aumento se observa a las 24hs y a los 7 días luego del entrenamiento, pero su expresión a 7 días es dependiente de la fuerza de entrenamiento, y por ende, de la fuerza o persistencia de la MLT formada.

¿Qué pasa con los niveles de expresión a tiempos mayores cuando ya no se observa retención de la memoria original? Hicimos un primer experimento comportamental en el que entrenamos los animales con un protocolo fuerte y luego evaluamos los niveles de retención 20 días más tarde, para estudiar si a este tiempo se observa retención de la MRO original (figura IV.II.3vii)

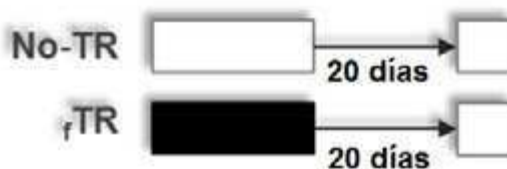


Figura IV.II.3vii. Diseño experimental

El ID% promedio para cada grupo 20 días post-TR fue: $ID_{\text{No-TR}} = (4 \pm 9)\%$ e $ID_{\text{fTR}} = (4 \pm 7)\%$. No se observaron diferencias significativas entre los grupos ($t=0.01625$, $p=ns$), lo que

indica que el grupo entrenado no muestra retención de la memoria original (figura IV.II.3viii).

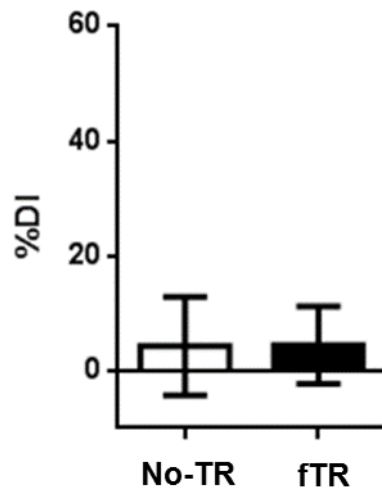


Figura IV.II.3viii. El grafico muestra el ID% del grupo no entrenado (No-TR) y el entrenados 15 minutos (grupo fTR) ($n_{No-TR}=9$ y $n_{fTR}=9$).

Luego, en forma análoga al diseño de la figura IV.II.3iv, analizamos los niveles de ARNm del grupo No-TR y del grupo fTR sacrificados 20 días post-TR. Estos fueron: $ARNm_{No-TR} = (1.0 \pm 0.4)$ y $ARNm_{fTR} = (1.0 \pm 0.5)$ (valores relativos al grupo No-TR). No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos ($t=0.1178$, $p=ns$) (figura IV.II.3ix).

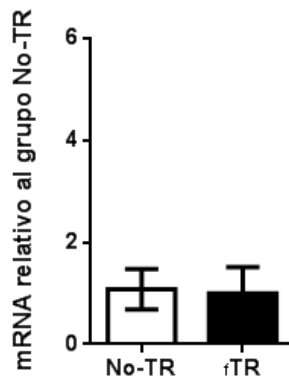


Figura IV.II.3ix. Valores de ARNm relativos al grupo No-TR ($n_{No-TR}=8$ y $n_{fTR}=10$).

Este resultado indica que al cabo de 20 días, cuando no se observa retención de la memoria original, los niveles de ARNm de CaMKII δ vuelven a los basales.

Los gráficos de esta sección se resumen en la próxima figura (IV.10viii). Obsérvese la similitud entre los resultados obtenidos a nivel comportamental y molecular.

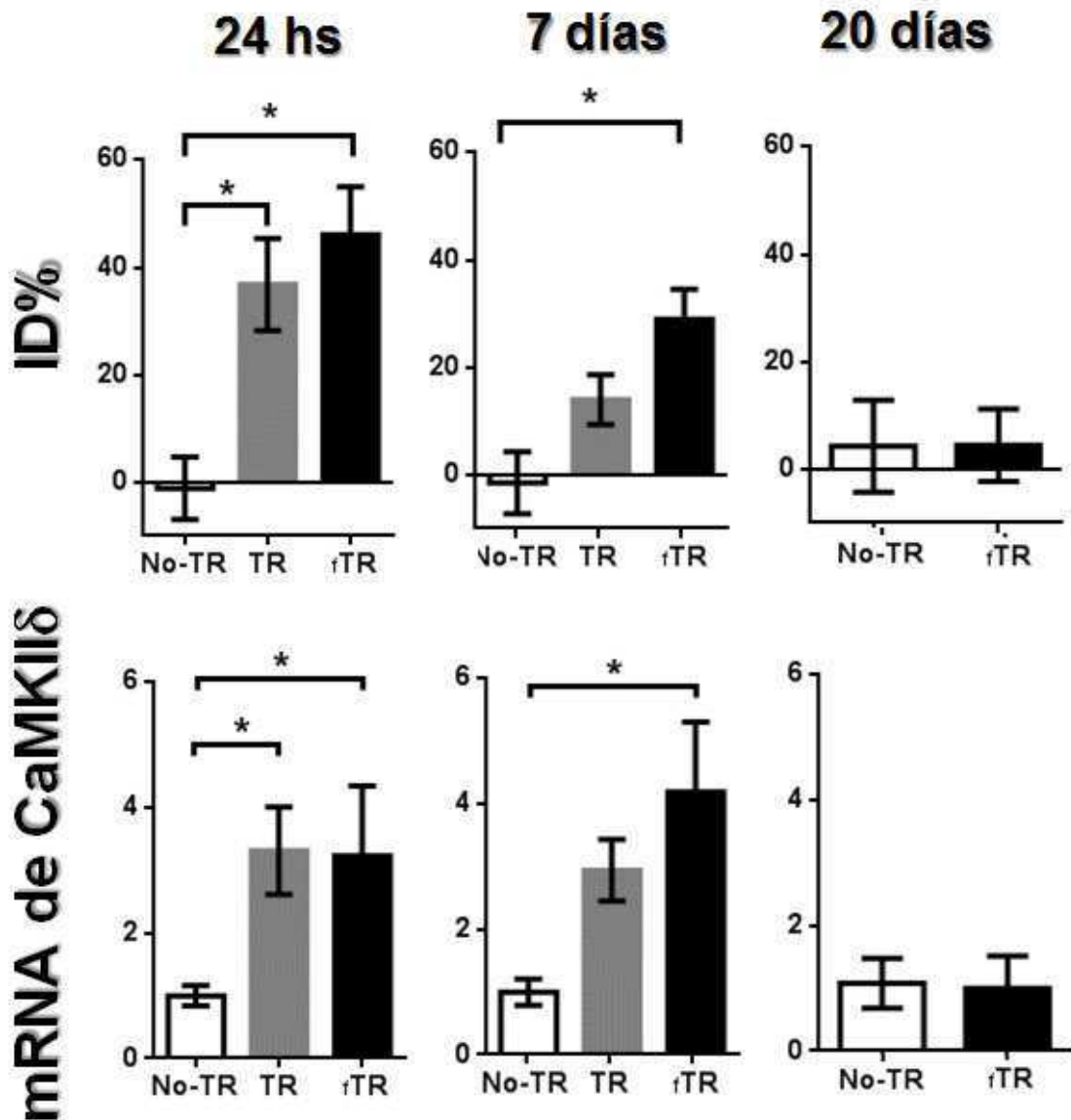


Figura IV.II.3x. Resumen de las figuras de la sección IV.II.3.

Por último, estudiamos los tiempos de exploración durante el entrenamiento estándar y fuerte para todos los experimentos de esta sección. Para ello, se realizó un ANOVA de dos factores, siendo uno de los factores el tiempo de entrenamiento y el otro factor, el experimento en cuestión. Al considerar al experimento como un factor, se analiza si el tiempo de exploración total pudo haber variado entre experimentos aún para un mismo tiempo de entrenamiento. El resultado del ANOVA indicó que no hay interacción entre ambos factores, que la fuente experimento no aporta variabilidad distinta de la aleatoria (por lo que se puede agrupar los datos de distintos experimentos), mientras que la fuente tiempo de exploración si es un factor de variabilidad que introduce diferencias significativas en el tiempo total de exploración.

Considerando este análisis, se calculó el tiempo de exploración promedio para cada tipo de entrenamiento en todos los experimentos. El valor calculado fue: TR: (13.3±0.9) s y fTR: (17.2± 0.9) s, respectivamente ($F_{1,38}=2.69$, $p=0.0229$), siendo ésta, una diferencia significativa. Esto indica que el tiempo de exploración promedio para los animales entrenados con un protocolo estándar (10 minutos) es significativamente menor al tiempo de exploración promedio de los animales entrenados con un protocolo fuerte).

IV.II.4. ROL DE CAMKII δ EN EL MANTENIMIENTO DE LA MLT.

Habiendo visto en el punto anterior que la expresión del gen de CaMKII δ aumenta fuera de la ventana de consolidación de la MLT, nos propusimos estudiar si este cambio es necesario para el mantenimiento de la pMLT. Para ello, empleamos una estrategia similar a la del punto IV.II.1 en la que disminuimos los niveles de ARNm luego del entrenamiento inyectando el OC al mensajero de CaMKII δ , sólo que esta vez la inyección la realizamos 24hs post-entrenamiento. El diseño del experimento se muestra en la figura IV.II.4i.

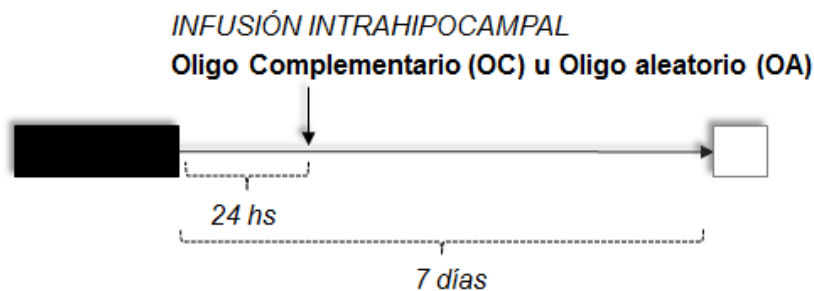


Figura IV.II.4i. Diseño experimental. Los animales fueron entrenados con un protocolo fuerte (15 min) y 24hs luego se los trató con OC u OA al ARNm de CaMKII δ (grupo OC y grupo OA, respectivamente).

El ID% promedio para cada grupo fue: $ID_{OA} = (29 \pm 4)\%$ e $ID_{OC} = (14 \pm 3)\%$. Observamos una disminución de alrededor del 50% y es significativa ($t=2.903$, $p=0.0082$) (figura IV.II.4ii).

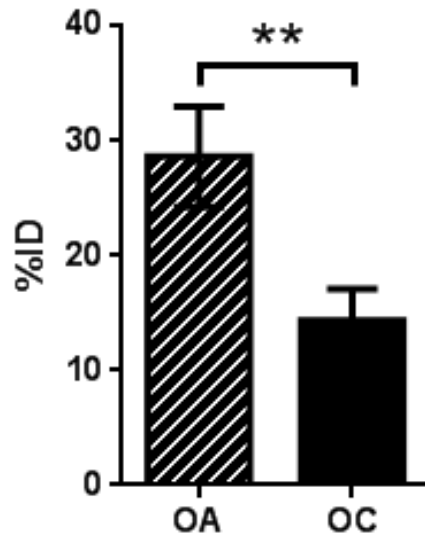


Figura IV.II.4ii. El grafico muestra el ID% del grupo tratado con OA y el tratado con OC. Los animales de ambos grupos recibieron protocolos de entrenamiento fuerte ($n_{No-TR}=10$ y $n_{fTR}=14$). $P^* < 0.005$.

La disminución intra-hipocampal del ARNm de CaMKII δ 24hs post-entrenamiento tuvo un efecto amnésico sobre la pMLT.

Este resultado indica que CaMKII δ es necesaria para el mantenimiento de la memoria de largo término persistente.

IV.II.5 POSICIONAMIENTO NUCLEOSOMAL EN TORNO AL SITIO KB Y AL SITIO DE INICIO DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL PROMOTOR DE CAMKII δ .

¿Existe algún cambio epigenético en torno al promotor del gen de CaMKII δ durante la consolidación de la MRO o su mantenimiento que acompañe la transcripción sostenida de su ARNm? Anteriormente en el laboratorio se observó que un entrenamiento fuerte al paradigma NOR induce un aumento en la acetilación de histonas en el promotor de *camk2d*, en la región regulada por NF- κ B (Federman et al., 2013). Este tipo de modificación en histonas suele ser temporario. En contraposición, el desplazamiento nucleosomal tendría una cinética más lenta, ya que requiere de mucha energía y la actividad conjunta de varias enzimas para su inducción. Además, podría tratarse de un mecanismo más estable o duradero que la acetilación de histonas. Con esto en consideración, supusimos que el cambio observado en la expresión de *camk2d*, y que se sostiene hasta 7 días luego del entrenamiento, podría estar acompañado de cambios en el desplazamiento nucleosomal en su promotor. De este modo, decidimos estudiar el grado de ocupación nucleosomal en torno a dos sitios claves para la expresión génica de CaMKII δ : el sitio κ B que puede actuar como *enhancer* de su expresión, y el sitio de inicio de transcripción (SIT) que tiene que ser reconocido por el *complejo de inicio de transcripción*. El dibujo de la figura IV.II.5iA, representa la idea de que los nucleosomas pueden desplazarse a lo largo del ADN de manera tal de ocupar sitios claves para la expresión génica, tales como el sitio κ B y el SIT. El esquema de la figura IV.II.5iB muestra el diseño del experimento: se comparó el grado de ocupación nucleosomal en los sitios κ B y SIT entre animales entrenados con un protocolo fuerte (grupo τ TR) y animales no entrenados (No-TR).

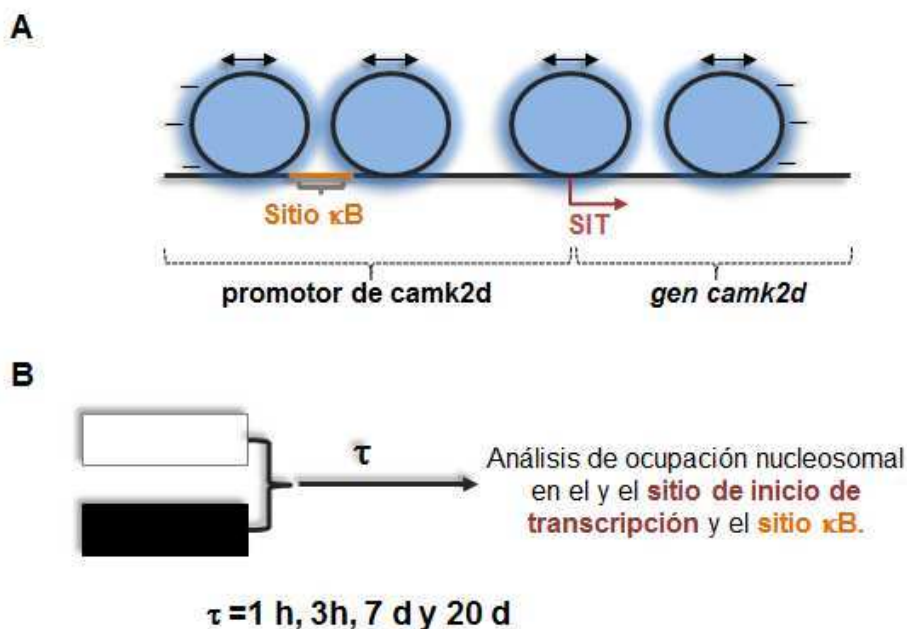


Figura IV.II.5i.A. Dibujo representativo del cambio en la posición de nucleosomas (círculos celestes) en los sitios κ B (naranja) y SIT (bordó) del promotor del gen *camk2d*. **B.** Diseño experimental.

El estudio se efectuó a cuatro tiempos luego del entrenamiento que consideramos de interés:

1h. A la hora del entrenamiento NF- κ B se encuentra posicionado en su sitio κ B y se observa un aumento en la acetilación de las histonas en esta región (Federman et al., 2013).

3h. A las 3hs se observó un aumento del ARNm de CaMKII δ (Federman et al, 2013) que sería necesario para la formación de memorias persistentes (sección IV.II.1B).

7d. A los 7 días post-TR se observa un aumento del ARNm de CaMKII δ (sección IV.II.3).

20d: Al día 20 no se observa retención de la memoria original y los niveles de ARNm vuelven al basal (sección IV.II.3).

La presencia de nucleosomas en ambos sitios se analizó tal como se indica en la sección III.9 y la información que se extrae es *cantidad de ADN codificando para la región de interés ocupada por nucleosomas*. A continuación se muestran los resultados.

IV.II.5.1 Ocupación nucleosomal en el Sitio κ B

1 hora después del entrenamiento

La cantidad de ADN ocupada por nucleosomas y relativa al grupo No-TR es: NoTR = (1.0 ± 0.2) y $f_{TR} = (0.7 \pm 0.3)$. Las diferencias no son significativas ($t=0.6070$, $p=ns$) (figura IV.II.5ii).

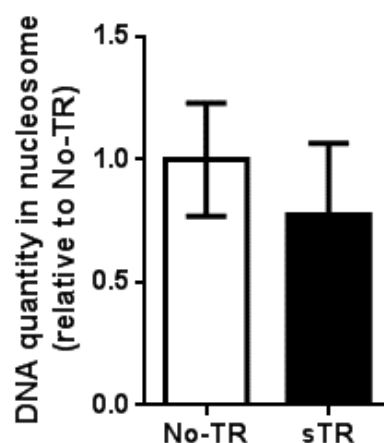


Figura IV.II.5ii. Cantidad de ADN conteniendo la secuencia κ B del promotor de CaMKII δ ocupada por nucleosomas. Valores relativos a los del grupo No-TR ($n_{No-TR}=4$ y $n_{fTR}=4$).

El resultado indica que 1 h post-entrenamiento no hay cambios en la ocupación nucleosomal en el sitio κ B.

3 horas después del entrenamiento

La ocupación nucleosomal a las 3hs es: No-TR=(1.00 ± 0.04) y f TR= (1.22 ± 0.04). Las diferencias son significativas ($t=3.655$, $p=0.0027$), lo que indica que el entrenamiento indujo un aumento del 22% en la ocupación del sitio κ B a las 3hs post-entrenamiento (figura IV.II.5iii).

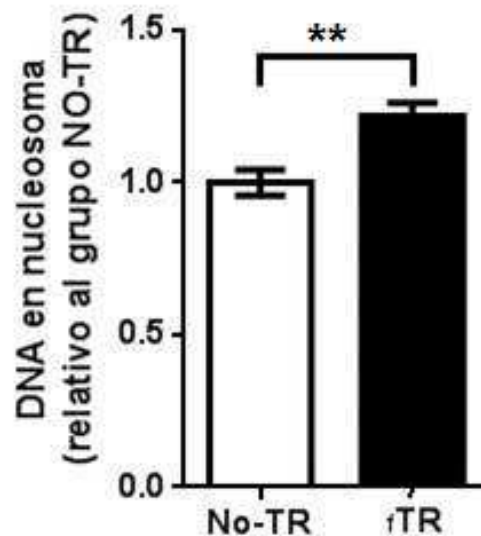


Figura IV.II.5iii. Cantidad de ADN conteniendo la secuencia κ B del promotor de *CaMKII δ* ocupada por nucleosoma. Valores relativos a los del grupo No-TR ($n_{\text{No-TR}}=9$ y $n_{f\text{TR}}=7$). $P^{**}<0.005$.

A las 3hs post-entrenamiento la ocupación nucleosomal en el sitio κ B es mayor para el grupo f TR que para el grupo No-TR.

¿Es la observación a las 3hs post-TR un fenómeno general para los sitios κ B de los promotores de otros genes? Para resolver esta pregunta estudiamos la ocupación nucleosomal de los sitios κ B en el promotor del gen *grin2a* que codifica para una subunidad del receptor de tipo NMDA y el gen *grin1* que codifica para una subunidad del receptor de tipo AMPA. Elegimos estos genes ya que ambos se vinculan con procesos mnésicos y tienen sitios regulados por NF- κ B.

El grado de ocupación de los sitios κ B de los promotores de ambos genes fue: No-TR_{NMDA}=(1.0 ± 0.2), f TR_{NMDA}= (0.8 ± 0.2) y No-TR_{AMPA}=(1.0 ± 0.2), f TR_{AMPA}= (0.8 ± 0.1). Las diferencias en ambos casos no fueron significativas ($t_{\text{NMDA}}=0.7255$, $p_{\text{NMDA}}=\text{ns}$; $t_{\text{AMPA}}=0.8251$, $p_{\text{AMPA}}=\text{ns}$) (figura IV.II.5iv).

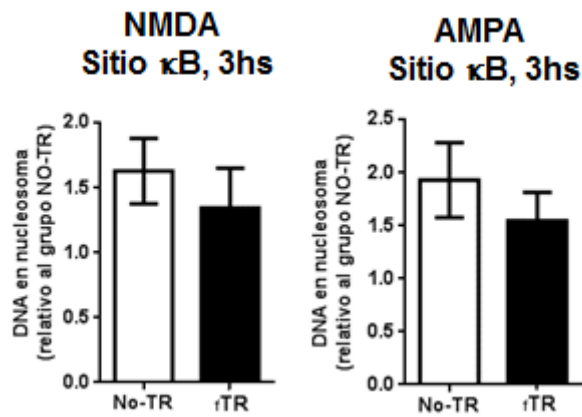


Figura IV.II.5iv. Cantidad de ADN conteniendo la secuencia κ B del promotor de dos genes que codifican para subunidades de los receptores de tipo NMDA y AMPA, respectivamente. Valores relativos a los del grupo No-TR ($n_{No-TR, NMDA, AMPA} = 5$ y $n_{iTR, NMDA, AMPA} = 4$).

Este resultado indica que el aumento en el grado de ocupación nucleosomal observado 3hs luego del entrenamiento en el sitio κ B del promotor de CaMKII δ es específico para este gen.

7 días después del entrenamiento

La ocupación nucleosomal el día 7 post-TR es: No-TR=(1.00 \pm 0.08) y iTR=(0.80 \pm 0.06). La diferencias entre ambos valores no es significativa ($t=1.926$, $p=ns$), lo que indica que 7 días post-TR no se observan cambios en la ocupación nucleosomal del sitio κ B (figura IV.II.5v).

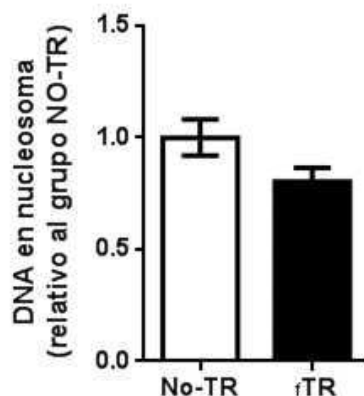


Figura IV.II.5v. Cantidad de ADN ocupado por nucleosomas en el sitio κ B del promotor de *camk2d*. Valores relativos a los del grupo No-TR ($n_{No-TR} = 5$ y $n_{iTR} = 5$).

20 días después del entrenamiento

La ocupación nucleosomal al día 20 post-entrenamiento es: No-TR=(1.0±0.1) y fTR=(1.3±0.1). Estos valores no son significativamente distintos entre sí (t=1.686, p=ns), lo que indica que 20 días post-TR no se observan cambios en la ocupación nucleosomal del sitio κB (figura IV.II.5vi).

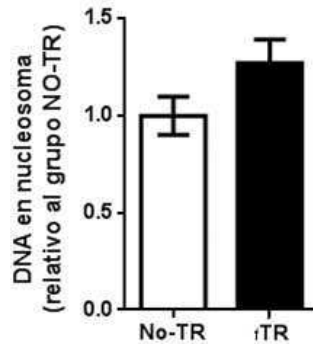


Figura IV.II.5vi. Cantidad de ADN ocupado por nucleosomas en el sitio κB del promotor de *camk2d*. Valores relativos a los del grupo No-TR ($n_{No-TR}=5$ y $n_{fTR}=5$).

En conjunto, el entrenamiento fuerte al paradigma NOR indujo un aumento significativo en la ocupación nucleosomal en el sitio κB a las 3hs, pero no 1h luego del entrenamiento ni 7 o 20 días.

IV.II.5.2 Ocupación nucleosomal en el Sitio SIT

1 hora después del entrenamiento

La presencia de nucleosomas en el sitio de inicio de transcripción, medida como ADN ocupado por nucleosoma, 1h post-TR fue: NoTR = (1.0±0.4) y fTR= (0.7±0.3). La diferencia entre ambos valores no es significativa (t=0.6826, p=ns) (figura IV.II.5vii).

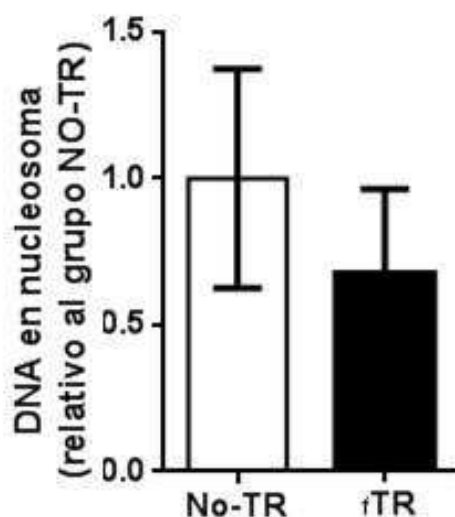


Figura IV.II.5vii. Cantidad de ADN ocupado por nucleosomas en el sitio SIT del promotor de *camk2d*. Valores relativos a los del grupo No-TR ($n_{No-TR}=3$ y $n_{fTR}=5$).

3 horas después del entrenamiento

La cantidad de ADN ocupada por nucleosomas y relativo al grupo No-TR fue: NoTR = (1.0 ± 0.1) y fTR = (0.6 ± 0.1) . La diferencia es significativa ($t=2.459$, $p=0.0301$), lo que indica que el entrenamiento indujo una disminución del posicionamiento nucleosomal en el SIT (figura IV.II.5viii).

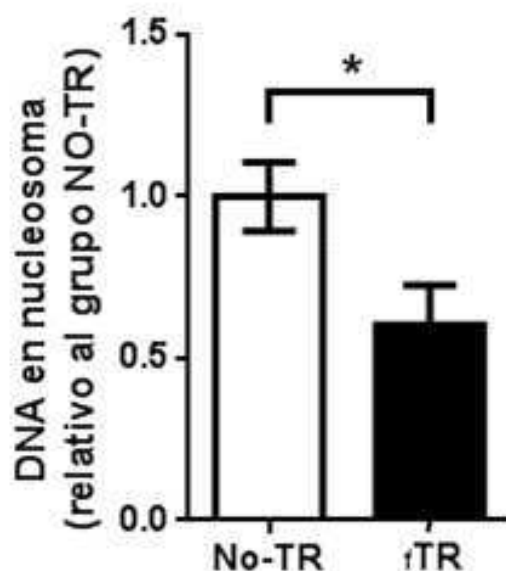


Figura IV.II.5viii. Cantidad de ADN ocupado por nucleosomas en el sitio SIT del promotor de *camk2d*. Valores relativos a los del grupo No-TR ($n_{No-TR}=7$ y $n_{fTR}=7$).

7 días después del entrenamiento

La ocupación nucleosomal en el sitio SIT el día 7 post-entrenamiento resultó: No-TR=(1.0±0.3) y f_{TR} =(3.0±0.7). La diferencia es significativa ($t=2.528$, $p=0.0354$), lo que indica que 7 días post-TR hay un aumento en la ocupación nucleosomal en el sitio SIT (figura IV.II.5ix).

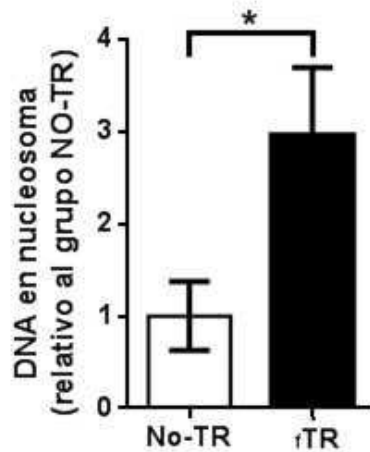


Figura IV.II.5ix. Cantidad de ADN ocupado por nucleosomas en el sitio SIT del promotor de *camk2d*. Valores relativos a los del grupo No-TR ($n_{No-TR}=5$ y $n_{fTR}=5$).

20 días después del entrenamiento

La ocupación nucleosomal el día 20 post-entrenamiento fue: No-TR=(1.0±0.1) y f_{TR} =(1.1±0.1). La diferencia no es significativa ($t=0.2952$, $p=ns$), lo que indica que 20 días post-TR no se observan cambios en la ocupación nucleosomal del sitio SIT como consecuencia de la exposición a objetos (figura IV.II.5x).

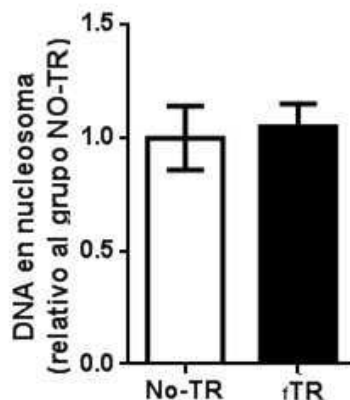


Figura IV.II.5x. Cantidad de ADN ocupado por nucleosomas en el sitio SIT del promotor de *camk2d*. Valores relativos a los del grupo No-TR ($n_{No-TR}=6$ y $n_{fTR}=8$).

En conjunto, el entrenamiento fuerte al paradigma NOR indujo una disminución en la ocupación nucleosomal en el sitio SIT a las 3hs del entrenamiento y un aumento a los 7 días, pero no se observaron cambios a la hora ni a los 20 días respecto al grupo no entrenado. En las discusiones se interpretarán estos resultados considerando además los observados para el sitio κB.

IV.II.6 CAMKIIδ SE ENCUENTRA PRINCIPALMENTE EN DENDRITAS, PRE-SINAPSIS Y NÚCLEOS DE NEURONAS HIPOCAMPALES.

Los resultados presentados hasta ahora en esta segunda parte de la tesis apoyan una participación clave de CaMKIIδ en la formación y mantenimiento de memorias de reconocimiento de largo término persistentes. Estos hallazgos nos llevaron a preguntarnos cuál es la función de CaMKIIδ y en qué región sub-celular tiene lugar. La localización de una proteína en la célula otorga información sobre su posible función, sobre todo en el caso de las neuronas que, además de los componentes comunes a todo tipo de célula, presentan dendritas y terminales axónicos en los que tienen lugar procesos fisiológicos y moleculares bien diferenciados.

De este modo, nos propusimos estudiar la localización sub-celular de CaMKIIδ en neuronas hipocampales. Para ello incubamos cortes cerebrales de ratón con anticuerpo contra CaMKIIδ. Centramos el análisis en la región CA1 del hipocampo, área que afectamos previamente con las inyecciones localizadas.

Basados en el antecedente de que CaMKII tiene efectos locales sobre espinas y que las isoformas CaMKII α y β se encuentran principalmente en dendritas y espinas excitatorias, decidimos visualizar CaMKIIδ en cortes coronales de ratones transgénicos Thy 1-GFP que expresan la proteína fluorescente GFP en neuronas excitatorias. Esta proteína se distribuye por toda la neurona, inclusive las espinas, permitiendo localizar y visualizar con excelente resolución las dendritas y terminales post-sinápticas. Cabe aclarar, que el transgen no se expresa en todas las neuronas, sino que esta diseñado para expresarse en una población aleatoria de ellas, permitiendo la visualización clara de cada neurona contrastada sobre un fondo homogéneo.

Se realizaron cortes coronales de 40μm, se incubaron con anticuerpo para CaMKIIδ (ver sección III.10) y se analizaron con microscopía confocal. A continuación, en la figura IV.II.6i, se muestra un ejemplo de las imágenes obtenidas para mostrar la región de estudio en relación con el corte coronal (el corte es un dibujo representativo obtenido del atlas del cerebro de ratón -Paxinos and Franklin, 2004- y en rosa se indica la región

abarcada por el análisis). Además se muestra la expresión de CaMKII δ en esta región y su relación con las neuronas marcadas con GFP.

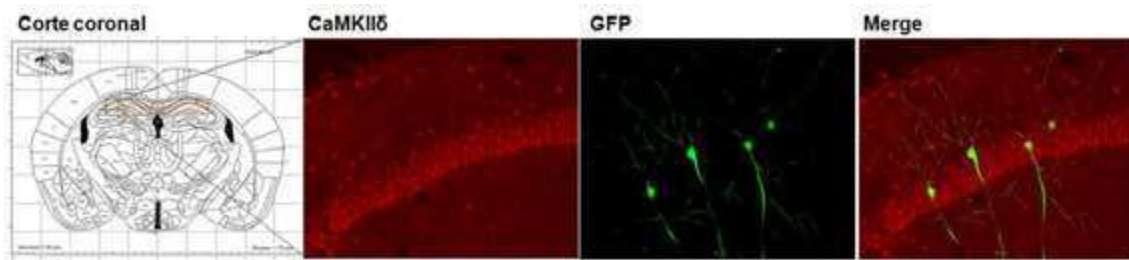


Figura IV.II.6i. A la izquierda se muestra una representación de los cortes coronales empleados y en rosa la región estudiada. A la derecha se muestran imágenes de la región de interés, obtenidas con el microscopio confocal (20x1.5).

IV.II.6A Determinación de la presencia de CaMKII δ en dendritas

En todas las dendritas analizadas, la presencia de CaMKII δ fue claramente observada (figura IV.II.6ii). Para determinar por un método analítico la presencia de CaMKII δ en dendritas se midió el perfil de fluorescencia sobre tres áreas rectangulares ubicadas a distinta altura de la dendrita y se comparó esta fluorescencia con la emitida por CaMKII δ fuera de la región abarcada por la dendrita (ver sección III.10C para más detalle). Se calculó la relación CaMKII δ dentro de la dendrita dividido CaMKII δ afuera, y luego se obtuvo el promedio de esta relación en los tres rectángulos. Se consideró que la dendrita contiene CaMKII δ sólo si la relación adentro/afuera para cada rectángulo era mayor a 1, al igual que el intervalo de confianza construido para el promedio de estos valores. En la figura IV.II.6ii, se muestra una de las imágenes utilizada en este estudio en la que se observa una de las regiones analizadas que incluye a la dendrita junto con la región elegida para el análisis fuera de la dendrita, a la derecha se muestra el perfil de fluorescencia para cada área.

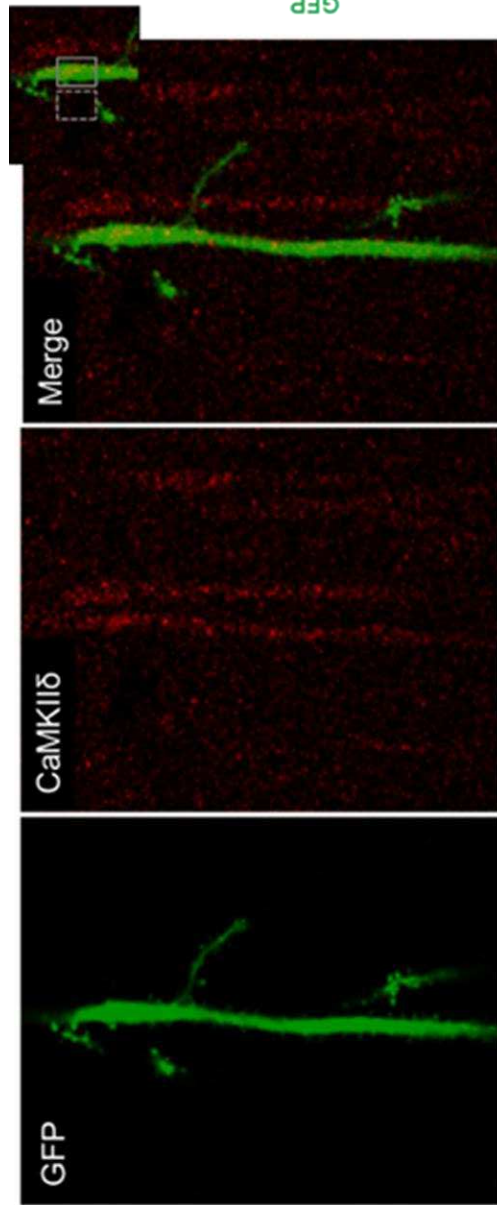


Figura IV.11.6ii. CaMKIIδ se encuentra en dendritas. La imagen de la izquierda muestra en verde la emisión por GFP, en el centro se observa la fluorescencia que indica la presencia de CaMKIIδ, y la imagen de la derecha es la superposición de ambas (60x1). Los cuadrados grises muestran las regiones empleadas para el análisis dentro de la dendrita (línea llena) y fuera (línea punteada). El gráfico de la derecha muestra el perfil de fluorescencia de GFP (verde), CaMKIIδ en la región que contiene la dendrita (rojo) y CaMKIIδ en la región fuera de la dendrita (marrón claro). Los ejes a la izquierda y derecha del gráfico miden intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias.

Empleando este procedimiento se encontró que i) CaMKII δ localiza en dendritas y ii) se encuentra en todas las dendritas analizadas (8 dendritas en dos cortes de dos animales distintos).

IV.II.6B.Determinación de la presencia de CaMKII δ en sinapsis

A continuación, se realizó un análisis similar sobre la sinapsis que se encuentran en las ramificaciones de las dendritas. Esta vez, los cortes provenientes de animales Thy1-GFP fueron incubados con anticuerpos para CaMKII δ y con anticuerpos para vGLUT-1, que se une al transportador de glutamato vesicular-1. La proteína vGLUT-1 se encuentra en terminales pre-sinápticas excitatorias y es comúnmente empleado como marcador de éstas. De este modo, la estrategia empleada nos permitió delimitar las regiones pre y post sinápticas y estudiar la presencia de CaMKII δ en cada una de ellas. Los perfiles de fluorescencia se obtuvieron sobre un rectángulo que incluyera todo el botón sináptico. Durante la observación visual de los perfiles se observó que en los casos en los que CaMKII δ se encontraba claramente en la sinápsis, su patrón de fluorescencia se asemejaba al de vGlut-1 en la mayoría de los casos. Esto nos sugirió que CaMKII δ se encontraría predominantemente en la terminal pre-sináptica. A continuación, se aplicó un método analítico para calcular la intensidad total de fluorescencia en la pre- y en la post-sinapsis. Con estos valores se calculó una relación intensidad pre/post que se empleó para determinar la presencia de CaMKII δ en cada uno de éstos empleando el criterio detallado en la sección III.10C. Los resultados obtenidos de este modo se encontraron en buena concordancia con el análisis realizado visualmente. Los resultados indican que, del total de las sinapsis estudiadas, un 46% contenía CaMKII δ en terminales pre-sinápticos y un 12% contenía CaMKII δ en la post-sinapsis (se analizaron 27 sinapsis en dos cortes de dos animales diferentes). En la figura IV.II.6iii se muestra un ejemplo representativo de una sinapsis analizada y el perfil de fluorescencia observado. En ella se observa que CaMKII δ está presente principalmente en la terminal pre-sináptica.

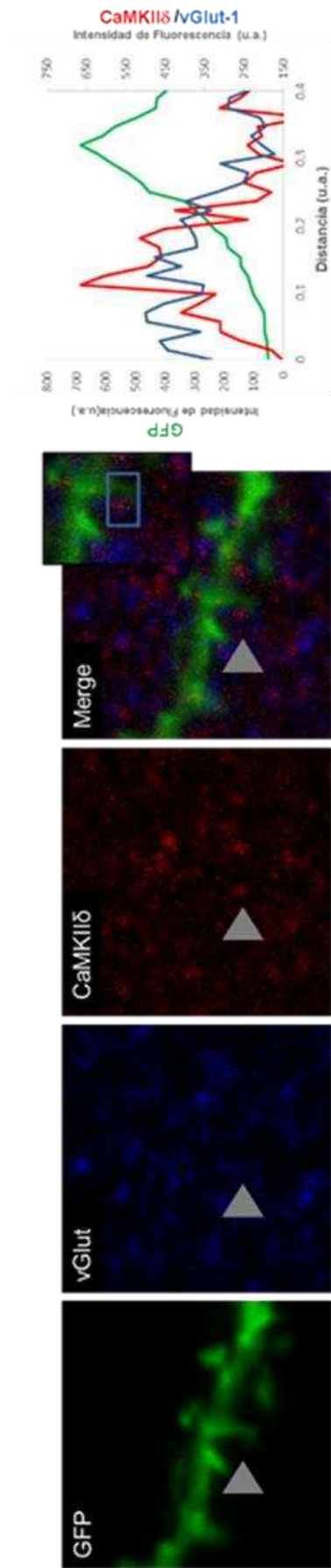


Figura IV.II.6iii. CaMKII δ se encuentra en pre-sinapsis. La imagen del extremo izquierdo en verde muestra la emisión por GFP, la imagen de centro-izquierda muestra la fluorescencia que indica la presencia vGlut-1, la imagen centro-derecha la marca de CaMKII δ , y la imagen de la derecha es la superposición de ambas (60x8). El recuadro en esta última imagen muestra el rectángulo sobre el que se analizó el perfil de fluorescencia de la sinapsis señalizada con la punta de flecha gris. El gráfico de la izquierda muestra el perfil de fluorescencia de GFP (verde), de vGlut-1 (azul) y de CaMKII δ (rojo) en intensidades arbitrarias dentro del rectángulo delimitado.

En las sinápsis restantes (%42), el análisis indicó que CaMKII δ localiza en ambos compartimentos con la misma relación. El análisis visual del perfil de fluorescencia permitió determinar que en casi todos estos casos CaMKII δ no se encontraba en ninguno de los dos compartimentos (figura IV.II.6iv).

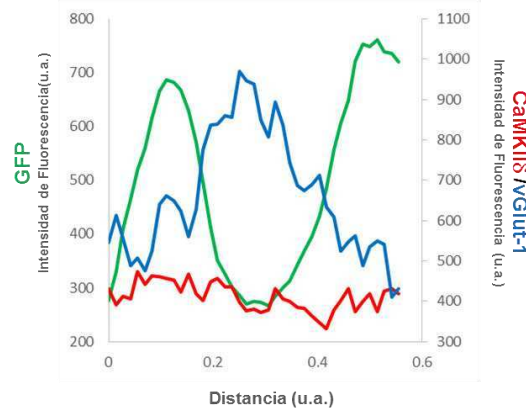


Figura IV.II.6iv. CaMKII δ no se localizó en las sinapsis de aproximadamente la mitad estudiadas. El gráfico muestra el perfil de fluorescencia de GFP (verde), vGlut-1 (azul) y CaMKII δ (rojo) en intensidades arbitrarias.

En conclusión, estos resultados indican que CaMKII δ se encuentra en sinapsis en casi la mitad de los casos observados, en cuyo caso se localiza principalmente en la terminal pre-sináptica.

IV.II.6C. Determinación de la presencia de CaMKII δ en el núcleo.

Para este análisis, se emplearon cortes coronales de animales salvajes (wild type) que se tiñeron con yoduro de propidio para marcar los núcleos y así poder estudiar la presencia de CaMKII δ en este compartimento celular. La figura IV.II.6v muestra una imagen representativa, en la que la localización nuclear de la proteína es evidente. Para determinar la localización de forma analítica se realizó un análisis similar a los anteriores, pero esta vez la región de interés elegida fue un rectángulo conteniendo al núcleo en su interior. Se efectuó la relación dentro/fuera para cada región de interés (cada núcleo), se calculó una relación promedio para todos los núcleos (10 núcleos de dos cortes de dos animales distintos) y se construyó un intervalo de confianza para esta relación: IC (relación dentro/fuera)= [1.20-1.47] (valor de t empleado para construir el intervalo: $t_{0.05/2, 9} = 2.262$). El IC es mayor a 1, lo que indica la presencia de CaMKII δ en el núcleo.

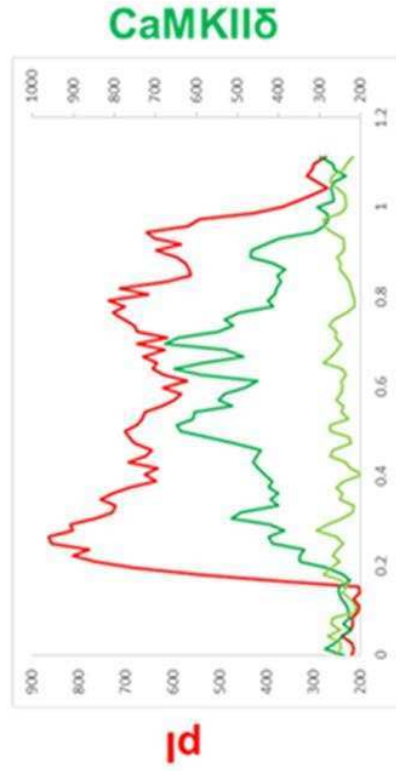
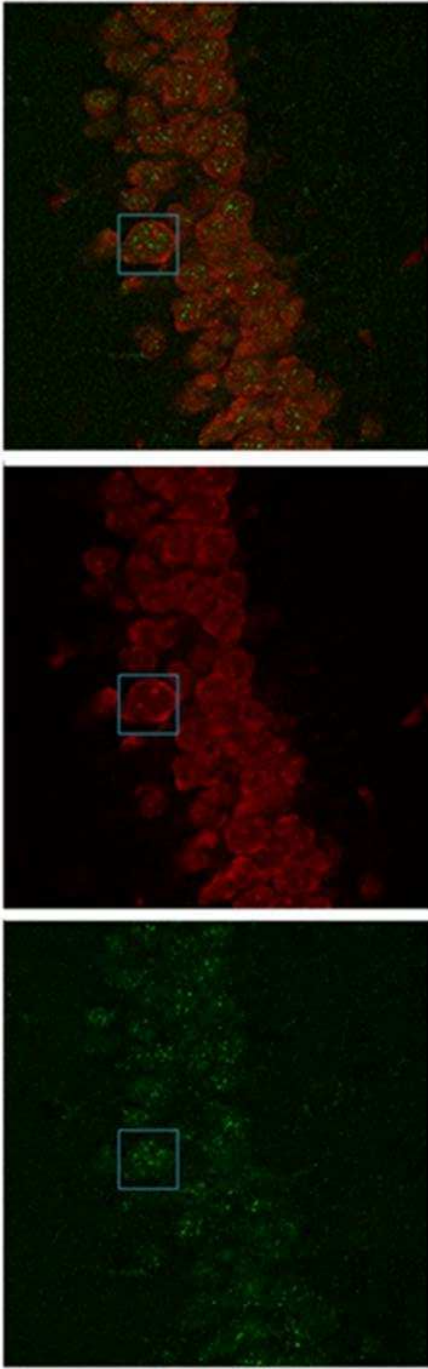


Figura IV.II.6v. CaMKII δ se encuentra en el núcleo. Las imágenes superiores muestran CaMKII δ a la izquierda y en verde, al centro la emisión del ioduro de propidio, y a la derecha la superposición de ambas imágenes. El cuadrado indica un ejemplo de la región analizada. El gráfico inferior muestra el núcleo delimitado por el ioduro de propidio (pl), el perfil de fluorescencia de CaMKII δ (verde fuerte) y el perfil de fluorescencia de CaMKII δ en una región extranuclear (verde claro)

En resumen, el análisis de las imágenes obtenidas indica que CaMKII δ localiza en dendritas, en la pre-sinapsis, en algunas post-sinapsis y en el núcleo de neuronas. En la sección siguiente se discutirá que información se obtiene de estos resultados sobre la posible función de CaMKII δ en neuronas en relación a su rol en la formación y mantenimiento de memorias persistentes.

V. DISCUSIÓN

V.1 ROL DE NF-κB EN LA CONSOLIDACION DE LA MLT

En roedores, NF-κB está involucrado en la consolidación de la memoria de diferentes tareas de aprendizaje (Yeh et al., 2002; Meffert et al., 2003; Freudenthal et al., 2005; de la Fuente et al., 2014). En el presente trabajo hemos determinado que en ratones de la cepa CF1, NF-κB se activa a los 45 minutos luego del entrenamiento en el paradigma NOR y que esta activación es necesaria para la formación de la MRO de largo término. El tiempo de activación observado es congruente con trabajos anteriores del laboratorio en los que se observó que ésta alcanza su punto máximo 45 minutos luego del entrenamiento en tareas comportamentales tales como evitación inhibitoria (Freudenthal et al., 2005) y condicionamiento de miedo contextual (de la Fuente et al., 2014). Estas dos tareas son de naturaleza aversiva debido a la utilización de un shock-eléctrico como estímulo no condicionado. Por el contrario, la tarea de NOR no utiliza un refuerzo aversivo o apetitivo. En conjunto, **estos resultados indican que NF-κB se activa durante la consolidación de distintos tipos de memoria y con una cinética similar, destacando la importancia y generalidad de este FT en procesos mnésicos en el hipocampo.**

Por otro lado, los resultados presentados en esta tesis indican que la activación de NF-κB durante la consolidación de la MRO es necesaria para la expresión del gen de respuesta inmediata ZIF268. Además, durante este proceso también se inducen cambios epigenéticos en el sitio κB del promotor del gen de respuesta tardía CaMKIIδ, sugiriendo que su expresión podría estar siendo regulada en parte por dicho FT (ver sección V.5.3). Estos resultados indican que durante la consolidación de la memoria NF-κB regularía la expresión de genes de respuesta temprana y tardía, y en base al rol observado para estos en particular (secciones V.3 y V.4), podemos decir que regula la expresión de genes que afectan la formación de la MLT y también su persistencia en el tiempo. Tal como se mencionó al comienzo, el rol de NF-κB en la formación de memorias de largo término se encuentra ampliamente documentado, sin embargo, hasta hace poco no se consideraba que también pudiera afectar componentes vinculadas a la persistencia de la MLT en formación. Las primeras evidencias fueron aportadas por este laboratorio hace unos años atrás, en un trabajo donde se observó que la acetilación de histonas es una marca molecular característica de la formación de

MLTs persistentes, que la activación de NF- κ B es necesaria para inducir este proceso y que NF- κ B se une a promotores de genes que poseen sus histonas acetiladas (Federman et al., 2013). De este modo, los resultados de esta tesis introducen un aporte más a esta observación, al presentar una nueva evidencia de que NF- κ B estaría regulando la expresión de *camk2d*, un gen que participa específicamente de la formación de una memoria de largo término persistente.

V.2 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE BDNF DURANTE LA CONSOLIDACIÓN DE LA MRO

No se encontraron aumentos en los niveles proteicos de BDNF durante la consolidación de la MRO. Dada la importancia de BDNF en procesos de plasticidad y memoria, este resultado contradice las expectativas iniciales. Sin embargo, la expresión proteica de BDNF es un proceso complejo (Cunha et al., 2010), por lo que a continuación pondremos este resultado en contexto y haremos un análisis más profundo del tema. Por otro lado, discutiremos este resultado en función de nuestro objetivo inicial que era estudiar el rol de NF- κ B en la regulación de la expresión de esta proteína.

V.2.1. Expresión Proteica

Empecemos por comparar este resultado con los antecedentes directos de la expresión de BDNF en la consolidación de la MRO. Los únicos trabajos que estudian cambios en la expresión proteica de BDNF durante la consolidación de la MRO fueron hechos en ratas e indican que 5 minutos de entrenamiento al paradigma NOR inducen un aumento en los niveles proteicos de BDNF en el área CA1 durante la consolidación de la MRO (Furini et al., 2010; Mello-Carpes et al., 2016). Por otro lado, en la tarea de *Reconocimiento Espontáneo de Localización* (REL), empleada para evaluar el fenómeno de separación de patrones, se encontró que 10 min de entrenamiento indujeron un aumento en la expresión proteica de BDNF en el giro dentado pero no en CA1 y el aumento se observó solo en los casos en los que el grado de exigencia de la tarea era elevado (Bekinschtein et al., 2013). Este paradigma comportamental es similar al NOR, en cuanto a que el roedor es expuesto a objetos que no ha experimentado previamente, por lo que dada la similitud en la experiencia comportamental involucrada en ambos paradigmas, podría esperarse una similitud en los eventos moleculares que las acompañan. En base a estos resultados surgen dos posibilidades para explicar por qué no se encontró un aumento en la expresión proteica de BDNF en la presente tesis: i) si el cambio proteico se da solo en la región CA1 o en el giro dentado, puede que este cambio no se pueda detectar al utilizar en los estudios todo el tejido hipocampal, y ii) basándonos en el trabajo de Bekinschtein et al., es posible

que al haber trabajado con protocolos de entrenamiento fuertes (15 min), éste no requiera de la expresión de BDNF durante la consolidación de la memoria, en forma similar a lo observado en el caso del entrenamiento REL. A favor de esta posibilidad, se encuentra otra evidencia en la que se ha observado que BDNF no es necesaria para la fase tardía de LTP cuando se emplean protocolos de estimulación fuerte, pero si lo es cuando el protocolo es más débil (Sakata et al., 2013; Aarse et al., 2016). De este modo, existen pocas, pero consistentes evidencias de que la expresión y rol de BDNF podría depender del “nivel de exigencia” de la tarea en cuestión.

A pesar de no haber visto cambios en los niveles proteicos de BDNF, no se puede descartar que durante la consolidación estén ocurriendo cambios a nivel de su ARNm. De hecho existen evidencias de que este tipo de situación se da para el gen de BDNF en particular. Dragunow y Walton, observaron que el LTP induce un aumento del mensajero de BDNF, pero no encontraron cambios a nivel proteico (Dragunow et al., 1993; Walton et al., 1999). En otro trabajo, se describe un aumento en la expresión del mensajero para BDNF en el hipocampo durante la consolidación de la memoria aversiva, sin cambios en la expresión proteica (Alonso et al., 2002). Otros trabajos también observan que la expresión de BDNF a nivel de ARN mensajero no correlaciona con su expresión proteica (Nanda and Mack, 2000; Pollock et al., 2001) ¿Acaso esta evidencia indica que el ARNm de BDNF no se traduce rápidamente a proteína? No necesariamente. El ARNm para BDNF codifica en realidad para un precursor de BDNF, pre-pro-BDNF, que se cliva a pro-BDNF y a continuación a BDNF, por ello muchas veces suele referirse a esta última proteína como *BDNF maduro* (Cunha et al., 2010). Una posibilidad es que la expresión del gen esté induciendo un cambio proteico en los precursores de BDNF y no necesariamente en su versión madura. Existen pocas evidencias, y en algunos casos contradictorias, respecto al tiempo de vida media de los precursores de BDNF, a su secreción y a su expresión o rol en plasticidad y memoria (revisado por Barker, 2009). Se ha documentado que la expresión de pro-BDNF es transitoria (Matsumoto et al., 2008; Dieni et al., 2012) y que el clivaje del precursor a BDNF maduro afecta la adquisición y extinción de la memoria de condicionamiento de miedo (Barnes and Thomas, 2008). Además se vinculó a pro-bdnf con la facilitación de LTD, aunque esta observación fue más adelante puesta en tela de juicio (Matsumoto et al., 2008).

En conclusión, dada la importancia de esta proteína en fenómenos de plasticidad, aprendizaje y memoria, y considerando su rol como gen de respuesta temprana, creemos que sería muy interesante estudiar la cinética del procesamiento del ARNm de BDNF a proteína madura y si esta se ve afectada en procesos de aprendizaje y memoria. En el presente trabajo no encontramos cambios a nivel de BDNF maduro, pero no podemos descartar que el gen se esté transcribiendo o incluso traduciendo a algunos de sus precursores, como fue mencionado anteriormente.

V.2.2. Regulación por NF-κB.

BDNF está propuesto como un gen de respuesta temprana (IEG por sus siglas en inglés, *Immediate early gene*) (Lanahan and Worley, 1998; Hermey et al., 2013). En general, la expresión proteica de los IEG se da inmediatamente a continuación de su expresión génica (Kovács, 2008). Siguiendo esta línea de razonamiento, se hipotetizó que evaluar cambios en los niveles proteicos de BDNF durante la consolidación de la memoria era una buena aproximación para estudiar si NF-κB regula la expresión del gen durante este proceso. Con esto en consideración, el hecho de no haber observado un aumento en la expresión proteica del gen implicaría que hay probabilidades del que el gen no se esté transcribiendo y que, en consecuencia, NF-κB no esté regulando al mismo durante la consolidación de la MRO. Sin embargo, en función de los procesos comentados en el punto anterior, en el caso de BDNF existen varios eventos moleculares entre la transcripción de su ARNm y su expresión a proteína madura (que fue la evaluada). La transcripción en sí de este gen es compleja, ya que sufre splicing alternativo a partir de 9 exones distintos por lo que su expresión se encuentra estricta y diferencialmente regulada (sección I.15.3). En consecuencia, nuestros resultados no descartan que el gen se esté transcribiendo durante la consolidación de la MRO. Si quisieramos determinar si NF-κB regula este proceso, podríamos inhibir la activación de este FT inmediatamente después del entrenamiento y estudiar la expresión de su ARNm a partir de una secuencia conservada entre los distintos productos de splicing, o bien a partir de cierto exón en particular, de manera de aprender más acerca de la regulación que tiene lugar en el promotor de este gen durante la consolidación de la memoria (Lubin et al., 2008).

V. 3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ZIF268 DURANTE LA CONSOLIDACIÓN DE LA MLT

Los resultados obtenidos en la presente tesis indican que los niveles proteicos de ZIF268 aumentan durante la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos en el hipocampo, con una cinética comparable a la de la activación de NF-κB, y que este aumento proteico es necesario para la consolidación de la MRO. Por último, hallamos que la expresión de ZIF268 es dependiente de la actividad de NF-κB, cumpliendo así con uno de nuestros objetivos principales de esta tesis que es identificar y caracterizar genes regulados por NF-κB durante la consolidación de la MRO.

V.3. 1. Expresión Proteica

Nuestros resultados muestran que los niveles proteicos de Zif268 en el núcleo aumentan transitoriamente 45 min después de la exposición a objetos novedosos, es decir durante la consolidación de la MRO. Existen varios trabajos documentando que la expresión de ZIF268 es rápidamente inducida luego de eventos de plasticidad sináptica (LTP) y aprendizaje (detallado en la introducción, revisado por Veyrac et al., 2014). Sin embargo, la evidencia orientada a estudiar la expresión de Zif268 específicamente durante la consolidación de la memoria de reconocimiento de objetos es escasa. En particular, en ratas se demostró que la expresión de ZIF268 en el giro dentado aumenta durante la consolidación de la MRO (Soulé et al., 2008) y que la exploración espacial de objetos novedosos desencadena la fosforilación, acetilación, y metilación de histonas en el promotor de *zif268* en el hipocampo (Gräff et al., 2012). En conjunto, estas evidencias están en línea con nuestros resultados y sugieren que la exploración de objetos novedosos induce la expresión de este gen. El aumento proteico de ZIF268 fue transitorio, ya que a los 90 minutos vuelve a sus niveles basales. Esta dinámica transitoria en su expresión también se ha documentado a nivel de ARNm (Hermeijer et al., 2013) e indica que la expresión de este gen se encuentra altamente regulada.

Por otro lado, en el presente trabajo hemos demostrado que la expresión de ZIF268 luego del entrenamiento es necesaria para la formación de una MRO de largo término. Su relación funcional con esta tarea ya había sido previamente observada en ratones knock-out para Zif268 que presentaban déficits en la MRO de largo termino (Bozon et al., 2002). Sin embargo, este estudio no permite dilucidar dónde (en qué estructura cerebral) ni cuándo (qué fase de la memoria) es importante este gen. De este modo, nuestros resultados son la primera evidencia de que en el hipocampo ZIF268 tiene un rol clave en la consolidación de la MRO. Ahora bien, ¿Cuál es exactamente su función? Si bien este estudio está fuera del alcance de la presente Tesis, considerando que ZIF268 es un factor de transcripción está claro que su principal función está vinculada a la expresión génica, y a juzgar por nuestros resultados, estos genes deben ser claves para la formación de la MLT. Actualmente no hay una identificación clara de cuáles son los genes regulados por este FT en el sistema nervioso. La evidencia disponible se obtuvo induciendo la sobre-expresión de ZIF268 y realizando análisis genómicos o proteómicos a gran escala (James et al., 2005; Baumgärtel et al., 2009). Ambos sugieren que Zif268 regula predominantemente la expresión de genes que codifican para proteínas relacionadas con el proteasoma, lo que fue confirmado en un estudio posterior (James et al., 2006). En base a estas evidencias, es posible que el papel de Zif268 en la formación de la memoria sea mantener el equilibrio correcto entre proteínas nuevas y viejas que participan en la traza mnésica, ya que previamente se ha demostrado que la actividad del proteasoma participa en diferentes formas de plasticidad (Obin et al., 1999; Speese et al., 2003; Juo and Kaplan, 2004) y memoria

(Merlo and Romano, 2007; Jarome et al., 2011; Kaang and Choi, 2012; Fustiñana et al., 2014).

V.3.2. Regulación por NF- κ B.

Durante la consolidación de la MRO, la expresión de ZIF268 concuerda temporalmente con la activación de NF- κ B y la inhibición de la activación de este último FT disminuye los niveles proteicos de ZIF268. Este último resultado indica que la expresión de ZIF268 es dependiente de la activación de NF- κ B durante la consolidación de la MRO en el hipocampo. Este es el primer trabajo mostrando que esta regulación tiene lugar durante procesos mnésicos, en particular la consolidación de la MRO.

Por último, nuestros resultados no nos permiten determinar si NF- κ B regula la expresión de ZIF268 de manera directa, uniéndose a su promotor, o de una manera más indirecta. Sin embargo, dado que la unión de NF- κ B al promotor de Zif268 ya se ha probado anteriormente ((Thyss et al., 2005; Deckmann et al., 2012) y que la expresión de ZIF268 es inducida rápidamente, es probable que NF- κ B este regulando la expresión de este gen en forma directa. El próximo paso será elucidar esta situación analizando la presencia de NF- κ B en el promotor de Zif268 mediante experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina (*ChIP*, por sus siglas en inglés).

V.4. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CaMKII δ

V.4.1. CaMKII δ , ¿la isoforma subestimada?

Existen numerosos trabajos que estudian la importancia de CaMKII, en particular de las isoformas α y β , en fenómenos de plasticidad y memoria (Lucchesi et al., 2011; Coultrap and Bayer, 2012; Liu and Murray, 2012; Hell, 2014 revisado en Ataei et al., 2015). Recientemente, se obtuvieron las primeras evidencias sugiriendo que la isoforma γ tendría un rol en la señalización de calcio nuclear (Ma et al., 2014). Sin embargo, no hay, a nuestro entender, trabajos que hayan estudiado el rol de CaMKII δ en este tipo de procesos. El motivo por el cual esta isoforma no recibió suficiente atención parece estar en el hecho de que en el sistema nervioso central se expresan predominantemente las isoformas α y β (que además son exclusivas del cerebro), mientras que CaMKII δ se expresa con mayor abundancia en otros tejidos, tales como el músculo cardíaco (Gray and Heller Brown, 2014; Bangaru et al., 2015). Estas particularidades probablemente impulsaron a que las isoformas α y β fueran las primeras en ser estudiadas en el SNC, hecho que se vio aún más fomentado luego del descubrimiento de la localización del RNA mensajero de CaMKII α en espinas.

V.4.2. Rol de CaMKII δ durante la consolidación de la MRO.

En esta Tesis inhibimos la expresión de CaMKII δ que tiene lugar durante la consolidación de la MRO y vimos que esto tuvo un efecto amnésico sobre la formación de una MLT persistente (pMLT, 7 días) sin afectar la formación de la MLT (24hs) (sección IV.II.1). Estos resultados indican que la expresión de CaMKII δ durante la ventana de consolidación participa de procesos que afectan componentes vinculadas a formas persistentes de la MLT. Este resultado es novedoso por dos motivos, primero porque el rol que le adjudica a CaMKII δ es distinto al observado para otras isoformas durante este proceso (sección I.17) y segundo porque indica que no todos los procesos moleculares que tienen lugar durante la consolidación son exclusivamente funcionales a la formación de una MLT, sino que ya en esta etapa ocurren procesos que determinarán la persistencia de esta MLT en el tiempo. Esta es la segunda vez que observamos que durante la consolidación se define (por lo menos en parte) la persistencia de la MLT en formación; en un trabajo anterior mostramos que la acetilación de histonas durante la consolidación está específicamente involucrada en la formación de pMLT y que *camk2d* es uno de los genes cuyo promotor se acetila en este proceso (Federman et al., 2013).

V.4.3. Rol de CaMKII δ en mecanismos de mantenimiento de la MRO.

Los resultados de los puntos IV.II. 3 y 4 indican que:

- i) La expresión del ARNm de CaMKII δ permanece inducida hasta por lo menos 7 días luego del entrenamiento.
- ii) Esta inducción es consistente con la retención de la memoria, ya que a los 7 días los niveles de ARNm para el grupo que recibió un entrenamiento standard dejan de ser significativamente distintos a los del grupo no entrenado. Este mismo grupo no presenta un nivel de retención significativo a una semana del entrenamiento. Por el contrario, el grupo que recibió un entrenamiento fuerte que genera una memoria que persiste hasta 7 días muestra una expresión sostenida del mensajero que sólo disminuye a niveles basales a los 20 días, cuando se pierde la retención de la memoria original.
- iii) La expresión de CaMKII δ es necesaria para el mantenimiento de la memoria ya que su inhibición en el hipocampo fuera de la ventana de la consolidación produce un efecto amnésico a los 7 días.

Estos resultados sientan precedente por diversos motivos. En primer lugar son la primera evidencia de que CaMKII δ es una quinasa clave en procesos que afectan el mantenimiento de la memoria. En segundo lugar, es una de las pocas evidencias de que la expresión de un gen puede mantenerse inducida hasta 7 días luego de una experiencia comportamental. La mayoría de los cambios de expresión estudiados hasta el momento indican que, en el hipocampo, estos tienen lugar dentro de las primeras 48 hs post-entrenamiento (revisado en Bekinschtein et al., 2010). En otras estructuras el único caso encontrado en el que se observan cambios sostenidos en la expresión génica, es un estudio en el que se observó que la expresión de PKM ζ aumenta en la corteza insular hasta siete días después del entrenamiento (Shema et al., 2011). Por otro lado, nuestros resultados concuerdan con estudios realizados en el sistema nervioso periférico en los que se observaron aumentos persistentes en la expresión de mensajero de CaMKII δ luego del daño al tejido nervioso (Xiao et al., 2002; Bangaru et al., 2015). Sorprendentemente, en estos trabajos se observaron aumentos hasta 28 días luego de la lesión, indicando que los cambios en la expresión pueden ser sostenidos por aún más tiempo que el observado en esta Tesis, y albergando la posibilidad de que entrenamientos más fuertes que los empleados aquí induzcan cambios que persistan hasta más de 7 días.

V. 5. DINÁMICA DEL POSICIONAMIENTO NUCLEOSOMAL.

¿UNA POSIBLE MARCA DE GENES INVOLUCRADOS EN CAMBIOS PERSISTENTES?

La expresión sostenida observada para CaMKII δ nos llevó a hipotetizar que debería haber algún cambio epigenético en el promotor de este gen que explicara estos resultados. Existen una vasta cantidad de mecanismos epigenéticos que han sido previamente involucrados en la formación y mantenimiento de la memoria (mencionados en la introducción, revisado por Guan et al., 2015; Zovkic and Sweatt, 2015). El *remodelamiento nucleosomal* es un ejemplo de un mecanismo epigenético que resulta, en parte, de la combinación de éstos y conduce a cambios en la naturaleza o la posición del nucleosoma (secciones I.10, I.11). De este modo, en lugar de proponer que el aumento en la expresión de CaMKII δ se encuentra acompañado de un cambio epigenético particular, supusimos que éste se debe a un conjunto de modificaciones epigenéticas que llevarían a cambios en la posición del nucleosoma y en consecuencia propusimos que el entrenamiento modificaría la posición (u ocupación) nucleosomal en regiones regulatorias claves del promotor de *camk2d*. Además propusimos que dos sitios claves serían el sitio κ B y el sitio de inicio de transcripción (SIT).

Los resultados obtenidos indican que en el sitio κ B la ocupación nucleosomal aumenta durante la consolidación de la memoria, específicamente a las 3hs (no se observaron cambios en los otros tiempos estudiados). Esto sugiere que los cambios en este sitio estarían regulando la expresión del gen *camk2d*, y resalta la importancia de NF- κ B en este proceso. Por otro lado, no se observaron cambios en la ocupación nucleosomal en los sitios κ B de genes que codifican para subunidades de los receptores AMPA y NMDA. Estos genes son regulados durante la consolidación de la MLT y también son dependientes de la activación de NF- κ B (sección 1.6, Kaltschmidt and Kaltschmidt, 2015), en consecuencia, este resultado sugiere que el desplazamiento nucleosomal observado en el sitio κ B durante la consolidación de la MRO es específico para el gen *camk2d*.

En cuanto al análisis realizado sobre el sitio SIT, se observó que la ocupación nucleosomal disminuyó durante la consolidación de la memoria y luego aumentó a los 7 días del entrenamiento, en la etapa que sería afectada por procesos vinculados al mantenimiento de la traza. Estos resultados son muy novedosos, en primer lugar porque es la primera evidencia de que este tipo de modificaciones (cambios en la ocupación nucleosomal) tienen lugar luego de una experiencia comportamental y en segundo lugar porque es la primera vez que se observan cambios tan sostenidos en una modificación epigenética en el hipocampo. Los mecanismos epigenéticos estudiados hasta el momento involucran cambios en las modificaciones post-traduccionales de proteínas, variantes de histonas, metilación del ADN y activación de proteínas remodeladoras dependientes de ATP ((Federman et al., 2013; Vogel-Ciernia et al., 2013; Zovkic et al., 2014; Maze et al., 2015, entre otros). Anteriormente se han mostrado cambios epigenéticos que tienen lugar 7 o incluso 30 días después de un entrenamiento (Zovkic et al., 2014), pero en estos casos las modificaciones se observaron en corteza y en el marco de la consolidación sistémica. Por lo tanto, esta sería la primera vez que se demuestra que tales regulaciones epigenéticas pueden perdurar tanto tiempo en el hipocampo. Por otro lado, es destacable que este mecanismo de regulación tenga lugar durante procesos moleculares vinculados a la consolidación y mantenimiento de la memoria, sugiriendo que el factor común sería afectar la persistencia de la MLT en el tiempo.

V.5.1. Importancia de los sitios de unión de factores de transcripción y el sitio SIT.

El grado de posicionamiento de un nucleosoma en determinada región del genoma es variable. Algunos genes poseen nucleosomas altamente posicionados (“en fase” o estables) y en otros la posición del nucleosoma es inestable (“desfasados” o dinámicos) (Jiang and Pugh, 2009). El posicionamiento nucleosomal depende considerablemente de la secuencia de ADN en cuestión, así como de la unión de

factores de transcripción y la acción de proteínas remodeladoras (introducido en I.11.2, Struhl and Segal, 2013).

Por otro lado, el posicionamiento nucleosomal en el promotor de un gen varía según se trate de un gen inducible o constitutivo. La hipótesis en boga sugiere que los *genes inducibles* presentan un promotor “rico” en nucleosomas, de manera tal de garantizar una transcripción basal baja y que cuando la célula se activa se reclutan factores que facilitan el remodelamiento nucleosomal afectando su posición en esta región e induciendo la expresión del gen. En cambio, los *genes constitutivos* poseen menos secuencias regulatorias en su promotor y la configuración nucleosomal es tal que el promotor se encuentra predominantemente libre de nucleosomas (Field et al., 2008; Bai and Morozov, 2010), garantizando una transcripción constante. Esto indica que la expresión del gen se verá afectada no solo por el grado de ocupación nucleosomal sino además por la cantidad o tipo de secuencias regulatorias presentes en el promotor. Además, basándonos en estos datos y nuestros resultados sobre cambios de expresión y remodelamiento nucleosomal, podríamos suponer que *camk2d* se trata de un gen inducible.

Las regiones de ADN que poseen secuencias consenso para FTs son sitios que regulan la expresión génica y en los que se observan cambios epigenéticos que modifican la accesibilidad de éstos al ADN. Un estudio muestra que en estos sitios se observan cambios en la acetilación de histonas que correlacionan con zonas sensibles a la ADNasa I, lo que indica que las regiones que poseen secuencias consenso para FTs tienen poca presencia nucleosomal (Guertin et al., 2012). En un trabajo previo, mostramos que el entrenamiento de NOR induce la acetilación de histonas en el sitio κB en torno al promotor de *camk2d*. Esta observación nos llevó a suponer que la accesibilidad a su secuencia consenso también se vería afectada por el grado de ocupación nucleosomal. En este mismo trabajo, se encontró que NF-κB se une a su sitio κB 1 h luego del entrenamiento. En esta tesis vimos que a las 3hs la ocupación nucleosomal en este sitio aumentó. Este resultado indica que la experiencia comportamental introduce cambios dinámicos en sitios de unión a FTs, en particular, el sitio κB. Se supone además que estas modificaciones estarían impactando sobre los niveles de expresión génica, pero tal como se comentará más adelante, aún no probamos esta relación directa.

Otra de las regiones más estudiadas en el posicionamiento y ocupación nucleosomal es la región dentro y adyacente al SIT. Se sabe que la posición del primer nucleosoma que se encuentra río abajo del SIT suele ser bastante estable, mientras que lo contrario ocurre para el primer nucleosoma río arriba (Jiang and Pugh, 2009; Bai and Morozov, 2010). Anteriormente se ha destacado la relevancia de la ocupación nucleosomal en este sitio en *Plasmodium* y levaduras (Tirosh and Barkai, 2008; Ponts et al., 2011).

Nuevamente, los resultados obtenidos en nuestro trabajo indican que la ocupación nucleosomal en esta región se encuentra fuertemente regulada como consecuencia de la experiencia comportamental.

V.5.2. Ocupación nucleosomal. ¿A favor o en contra de la expresión génica?

¿Afectan estos cambios la expresión del gen? ¿Cómo lo hacen? En la actualidad no es posible interferir la ocupación nucleosomal en un sitio particular de manera específica, por lo que no pudimos estudiar cómo este cambio epigenético en cada uno de los sitios afecta la expresión del gen. A continuación, describiremos lo que se sabe hasta el momento respecto de la relación entre este proceso y la expresión génica.

De acuerdo a la bibliografía, los cambios en la expresión génica como consecuencia de la presencia de un nucleosoma dependen del sitio particular que se esté ocupando. A continuación, mencionaremos lo que se sabe para los sitios κB y SIT.

Sitio κB

En general, se ha observado que la presencia de un nucleosoma en secuencias consenso para FTs modula negativamente la expresión del gen en cuestión, llevando al silenciamiento o a una disminución en la cinética de expresión (Bai and Morozov, 2010). En algunos casos, se ha observado que cierta clase de FTs pueden unirse a sus sitios blanco aún en presencia de nucleosomas sin la necesidad de llevar a un cambio en la posición del mismo (Ballaré et al., 2013; Struhl and Segal, 2013). Esto tiene lugar probablemente gracias al reclutamiento de proteínas remodeladoras de la cromatina que introducen cambios en la unión ADN-histona y exponen ciertas regiones dentro del nucleosoma en cuestión. De este modo, parecería ser que la presencia de un nucleosoma podría o bien disminuir la cinética de expresión, o bien aumentarla si el mismo se utiliza como “plataforma” de unión al ADN, por ejemplo cuando son reconocidas las marcas post-traduccionales de histonas. El caso de NF- κB es muy particular y uno de los más estudiados, ya que se ha observado que el mismo podría unirse a su secuencia consenso aún en presencia del nucleosoma y su cinética de regulación no se vería afectada (Angelov et al., 2004). Sin embargo, un trabajo más reciente del mismo autor indica que la unión a su secuencia consenso sólo es posible si la misma se encuentra en los extremos del nucleosoma y no en la región central (Lone et al., 2013).

Considerando que NF- κB se une a este sitio 1h post-entrenamiento (Federman et al., 2013), una posible interpretación de los resultados es que inicialmente no se requieren

cambios en la ocupación nucleosomal en torno al sitio κ B para que la unión del FT tenga lugar, sin embargo unas horas más tarde, aumentaría la ocupación en este sitio de manera tal de regular la expresión dependiente de NF- κ B probablemente de manera negativa. Una forma de evaluar si la ocupación nucleosomal en el sitio κ B observada a las 3hs post-entrenamiento afecta la afinidad de unión del mismo sería comparar la presencia de NF- κ B en dicha secuencia a las 3hs post-entrenamiento entre animales entrenados y no entrenados o bien entre animales sacrificados a la hora (cuando NF- κ B está unido al sitio) y a las 3 horas post-entrenamiento (cuando se ve el cambio nucleosomal), mediante la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina.

Sitio SIT

En el caso del sitio de inicio de la transcripción, la expresión génica tiende a correlacionar negativamente con la presencia de nucleosomas, ya que la unión de la ARN PolIII y los factores generales de transcripción es más voluminosa y se encuentra estéricamente más impedida (Bai and Morozov, 2010; Ponts et al., 2011). Sin embargo, nuevamente, la literatura no apunta a una dirección unívoca ya que, por ejemplo, un estudio hecho a gran escala en el genoma de levaduras indica que la ocupación nucleosomal en este sitio está vinculada a un incremento en la plasticidad transcripcional, que puede darse tanto a favor como en contra de la expresión del gen asociado (Tirosh and Barkai, 2008). Este trabajo además aporta un dato interesante en cuanto a que se observó que la expresión de los genes que poseen un alto grado de ocupación nucleosomal en su sitio SIT son más sensibles a cambios en la expresión asistidos por remodelamiento nucleosomal.

En nuestro caso, nosotros vimos un cambio opuesto en la ocupación nucleosomal en el sitio SIT (desocupado a ocupado), entre las 3hs y los 7 días luego del entrenamiento. En principio, esto sugeriría un cambio en la expresión, y uno esperaría que fuese en favor de la expresión al principio y del silenciamiento o disminución de la cinética de expresión al final, ya que con el correr de los días, los niveles de ARNm para CaMKII δ bajan (vuelven al basal a los 20 días). Sin embargo, nuestros resultados indican que los niveles de ARNm a los 7 días luego del entrenamiento siguen siendo mayores a los del grupo control. Una interpretación de estos resultados es que la cinética de transcripción cambió, pero el gen no fue completamente silenciado o bien que el ARNm cuantificado no proviene de ARN recientemente sintetizado. Para resolver esta cuestión, podrían analizarse los niveles del pre-ARNm 7 días luego del entrenamiento (ARNm en proceso de transcripción), cuando la ocupación nucleosomal aumenta y estudiar si estos son mayores o iguales a los del grupo entrenado o si son menores a los observados a tiempos anteriores.

Como conclusión de esta sección, los cambios en la ocupación nucleosomal son clave en la regulación de la expresión génica pero es difícil predecir en que dirección afectarán la expresión (Chereji and Morozov, 2015). En particular, nuestros resultados no nos permiten predecir el efecto que la ocupación nucleosomal en cada sitio tiene sobre la expresión de *camk2d*, sin embargo sí queda claro, de lo expuesto más arriba, que este cambio está directamente vinculado a la regulación génica o plasticidad transcripcional, que evidentemente tiene lugar en el gen de *camk2d* hasta una semana luego del entrenamiento.

V.5.3. Rol de NF- κ B en la regulación de la expresión de CaMKII δ

Cabe señalar, que en esta tesis no se realizó un experimento funcional que permitiera definir que efectivamente NF- κ B regula la expresión de CaMKII δ durante la consolidación de la MRO. Los resultados obtenidos indican solamente que la ocupación nucleosomal en el sitio κ B cambia como producto del entrenamiento. Sin embargo, estos resultados se suman a observaciones previas en las que se encontró que NF- κ B se une a este sitio durante la consolidación de la MRO (Federman et al., 2013) y que además son consistentes con un trabajo publicado recientemente en el que se observa un aumento en la unión de este FT al promotor de *camk2d* luego de la exposición a un ambiente enriquecido (Neidl et al., 2016). En conjunto, estos resultados son una fuerte evidencia de que NF- κ B regularía la expresión de CaMKII δ en este proceso. Una forma de probar esto fehacientemente sería inhibiendo la activación de NF- κ B durante la consolidación de la MRO y evaluando si esto afecta los niveles de ARNm medidos a las 3hs post-entrenamiento.

V.5.4. Cambios en la ocupación nucleosomal como un mecanismo exclusivo de genes vinculados a MLTs persistentes.

La pregunta con la que se inicia la sección V.5. es “atractiva”, pero también ambiciosa. Se origina en el hecho de que las modificaciones en el posicionamiento del nucleosoma son energéticamente muy costosas e involucran la acción cooperativa de factores de transcripción, complejos remodeladores de nucleosomas y otras modificaciones epigenéticas (Teif et al., 2013; Meagher, 2014). En consecuencia, los cambios introducidos en la expresión génica podrían ser más duraderos y quizás específicos de entrenamientos fuertes, ya que estos inducen un mayor grado de cambios epigenéticos, tal como la acetilación de histonas (Federman et al., 2013). Una forma de evaluar si este proceso es específico de genes vinculados a la formación y mantenimiento de memorias persistentes sería estudiar si también se observa en genes que son necesarios para la formación de la MLT exclusivamente.

V.6. LOCALIZACIÓN SUB-CELULAR DE CaMKII δ Y POSIBLES FUNCIONES

Una pregunta relevante que surge en este punto es cómo contribuye CaMKII δ a la formación y mantenimiento de memorias persistentes. En esta tesis dimos los primeros pasos en dirección a responder esta pregunta, estudiando la localización sub-celular de esta isoforma en neuronas piramidales del hipocampo.

V.6.1. Dendritas

Los estudios de inmunofluorescencia sobre cortes cerebrales de animales transgénicos que expresan GFP en algunas de sus neuronas piramidales nos permitieron determinar que CaMKII δ se encuentra presente en todas las dendritas estudiadas. En algunos casos también se observó la presencia de CaMKII δ en espinas dendríticas. Existen numerosos antecedentes documentando la presencia de las isoformas α y β en espinas dendríticas (Liu and Jones, 1997; Shen et al., 1998; Shen and Meyer, 1999; Ahmed et al., 2006). Debido a que CaMKII puede formar estructuras homo- o heteroméricas, es posible que la isoforma δ esté presente en dendritas y espinas como parte de una proteína multimérica que contiene también las isoformas α y β .

V.6.2. Pre-sinapsis

La presencia de CaMKII δ en aproximadamente la mitad de las terminales presinápticas estudiadas fue novedosa y concluyente. A pesar de que existen evidencias sólidas a favor de que la enzima CaMKII en la pre-sinapsis tiene un rol crucial en procesos de plasticidad sináptica, LTP y liberación de neurotransmisores (Ninan and Arancio, 2004; Lu and Hawkins, 2006; Wang, 2008), aún no se ha estudiado la función específica de la enzima en este compartimento en memoria y se sabe poco acerca de la presencia de cada isoforma en la pre-sinapsis. Los estudios disponibles indican que las isoformas α , β y γ se encuentran en vesículas sinápticas y que CaMKII α se encuentra en algunas pre-sinapsis excitatorias asimétricas (axo-dendríticas o axo-somáticas) (Liu and Jones, 1996, 1997; Takamori et al., 2006; Liu and Murray, 2012). De este modo, nuestros resultados son la primera demostración de que CaMKII δ está presente en terminales pre-sinápticas excitatorias, en particular en sinapsis simétricas (axón-espina). Algunas de las principales funciones que se le adjudican a CaMKII en la pre-sinapsis, y que nosotros proponemos podrían estar siendo llevadas cabo por la isoforma δ en particular, son fosforilar la sinapsina1 presente en las vesículas sinápticas y los canales de calcio voltaje dependientes (Ca_v2.1) pre-sinápticos. La acción de CaMKII sobre sinapsina permite el desprendimiento de ésta del citoesqueleto y aumenta el pool de vesículas disponibles en el espacio pre-sináptico, mientras que la fosforilación del canal

CaV2.1 desacelera su inactivación favoreciendo la liberación de neurotransmisores (Wang, 2008).

Por último, pero no menos importante, el hecho de que CaMKII δ no se encuentre en todas las sinapsis estudiadas es una observación que merece ser destacada. En cultivo celular de neuronas hipocampales se ha observado que la traslocación de las isoformas α y β a la densidad post-sináptica es modulada por la actividad neuronal y la polimerización de actina (Shen and Meyer, 1999; Ahmed et al., 2006). Estos antecedentes permiten especular con la posibilidad de que la translocación de CaMKII δ a la sinapsis también sea modulada por la actividad neuronal, y que por ello no la hayamos encontrado presente en todas las sinapsis estudiadas. Nuestro análisis también arrojó evidencia de que CaMKII δ se localiza en algunas sinapsis. En conjunto, estas observaciones son llamativas y potencialmente útiles, ya que por ejemplo, sugieren que podría emplearse a CaMKII δ como marcador de terminales activas. En conclusión, nuestros resultados son una primera aproximación al tema y llaman a profundizar su investigación en el futuro.

V.6.3. Núcleo

La tinción de cortes cerebrales con yoduro de propidio nos permitió determinar la presencia de CaMKII δ en el núcleo de neuronas piramidales. En el sistema nervioso central, su expresión nuclear fue documentada anteriormente en células granulares cerebrales (Takeuchi et al., 1999), pero esta es la primera evidencia mostrando su presencia nuclear en neuronas piramidales del hipocampo. Algunas variantes de la isoforma δ tienen señal de localización nuclear y su rol en esta organela ha sido descrito en otros tejidos, tal como el músculo cardíaco (Gray and Heller Brown, 2014). Recientemente, se identificó que la activación neuronal induce la translocación nuclear de la isoforma γ y que también contiene secuencias de localización nuclear (Ma et al., 2014). De este modo, es posible que la translocación de la isoforma δ al núcleo se dé por la presencia de una secuencia de localización nuclear en su secuencia de aminoácidos, o bien, asistida por la isoforma γ . Su presencia en el núcleo puede darnos algunos indicios de cuál sería su función celular. Por ejemplo, la isoforma γ transporta Ca^{2+} /calmodulina de la sinapsis al núcleo, activa la fosforilación de CREB y de este modo induce la expresión génica (Ma et al., 2014), por lo que CaMKII δ podría estar acompañando este proceso. Por otro lado, se encontró que CaMKII δ fosforila a la histona H3 y a la desacetilasa HDAC4 (Little et al., 2007; Zhang et al., 2007; Awad et al., 2015). Particularmente, en células del corazón se ha demostrado que CaMKII δ interactúa con HDAC4 (tanto en el núcleo como en el citoplasma), pero no con HDAC5 o HDAC9 (todos miembros de la familia Clase II de las HDACs), induciendo así su exportación nuclear y afectando la transcripción génica (Little et al., 2007; Zhang et al., 2007). Curiosamente, la translocación núcleo-citoplasma de HDAC4 en el sistema

nervioso central depende de la activación de receptores glutamatérgicos y la cascada de señalización de Ca^{2+} , eventos que son desencadenados por procesos mnésicos (Sando et al., 2012; Schlumm et al., 2013). Además, HDAC4 es uno de los subtipos de HDAC más estudiados en eventos de plasticidad y memoria. En general, las desacetilasas se vinculan con mecanismos que llevan a una disminución en la expresión génica y en particular para el caso de HDAC4, se ha encontrado que esta enzima regula un programa de transcripción esencial para la plasticidad sináptica y memoria (Sando et al., 2012; Koppel and Timmusk, 2013). Por otra parte, la pérdida selectiva de HDAC4 pero no HDAC5 en el cerebro induce deficiencias en el aprendizaje dependiente del hipocampo y su importancia en fenómenos de memoria y plasticidad sináptica de largo término se encuentra conservada entre distintas especies, incluyendo *Drosophila* y *Caenorandithis* (Wang et al., 2011; Fitzsimons et al., 2013; Schwartz et al., 2016). De este modo, podría ser que durante la formación y mantenimiento de MLTs persistentes CaMKII δ trasloque al núcleo, fosforile a la histona H3 y a HDAC4 (induciendo su translocación al citoplasma) e introduzca así cambios sostenidos en la expresión génica.

V.7. FORMACIÓN Y MANTENIMIENTO DE MEMORIAS PERSISTENTES: RETOMANDO LA HIPÓTESIS DE CRICK.

Tal como mencionamos en la introducción, Crick postuló que para que la memoria perdure en el tiempo tienen que haber cambios plásticos en la sinapsis y mecanismos enzimáticos que se sostengan de forma autónoma, de manera tal de mantener los cambios sinápticos. A la luz de nuestros resultados, proponemos que CaMKII δ es una de estas enzimas que estaría expresándose de manera sostenida y regulando mecanismos celulares que permiten mantener los cambios introducidos durante la consolidación de la MLT. Su rol nuclear sería clave en este proceso ya que sugiere que esta enzima puede introducir cambios en la expresión génica. El hecho de que se lo vincule con la fosforilación de H3 y HDAC4, le da aún más fuerza a esta hipótesis, dado que estas modificaciones podrían afectar la expresión de un gran número de genes haciendo que CaMKII δ sea un regulador maestro de la expresión génica. Además, muchos de los genes cuya expresión se ve modulada por la histona HDAC4 y la fosforilación de H3 son claves en procesos mnésicos que afectan la persistencia de la memoria de largo término, entre estos se destacan: CaMKII α , Homer1, Arc y Zif268 (Bekinschtein et al., 2010; Besnard et al., 2014; Reul, 2014). El programa génico afectado por HDAC4 también involucra proteínas de liberación vesicular y canales de calcio dependientes de voltaje, por lo que puede que CaMKII δ tenga un rol especial regulando los mecanismos que mantienen activa la pre-sinapsis (Sando et al., 2012).

Una de las cosas que aún queda por resolver es cómo estaría perpetuando CaMKII δ su propia expresión. Aunque no hay evidencias de que HDAC4 o la fosforilación de H3 regulen la expresión de *camk2d*, es posible que estas interacciones sean parte de los engranajes moleculares implicados en sostener el aumento en la expresión de CaMKII δ . Una secuencia de eventos que podría estar teniendo lugar es que la activación de CaMKII δ durante la consolidación induzca la fosforilación de las proteínas HDAC4 y H3 que a su vez introducirían cambios en la expresión génica que favorezcan la expresión de CaMKII δ . A partir de allí, la expresión sería perpetuada gracias a la translocación nuclear de CaMKII δ , de manera tal que la expresión de CaMKII δ generaría un mecanismo de feed-back positivo sobre su propio gen.

Por otro lado, nosotros encontramos que la inhibición de la expresión de CaMKII δ a las 24hs del entrenamiento, tiene un efecto amnésico en la memoria evaluada a los 7 días. Una pregunta que nos queda por resolver es ¿qué habríamos observado si el testeó lo hubiésemos realizado a las 24hs? Una opción es haber obtenido el mismo resultado que durante la consolidación, es decir que la memoria a las 24hs de la inhibición de CaMKII δ no se vea afectada. Tal como se mencionó en la introducción, ya se ha observado que inhibir procesos moleculares que tienen lugar 24hs luego de un entrenamiento, tiene un efecto específico sobre la memoria que se expresa a tiempos más largos (Katche et al., 2010, 2012b). Además, nosotros observamos un aumento del ARN mensajero de CaMKII δ y en un trabajo reciente se demostró que inhibir la síntesis de ARNm en el hipocampo 24hs luego de un entrenamiento no afecta la retención a las 24hs pero sí a los 7 días (Katche et al., 2010). De este modo, una posibilidad es que los mecanismos que participan de la formación y mantenimiento de memorias de largo término persistentes no tengan un efecto directo sobre la memoria que va a expresarse al día siguiente, sino que están destinados a introducir cambios cuyos efectos se evidencian a tiempos más largos. De hecho, es llamativo que existe una vasta cantidad de trabajos que estudian el fenómeno de *reconsolidación* y documentan que en animals cuya memoria no es re-activada la administración intra-hipocampal de distintos agentes amnésicos, entre ellos inhibidores de síntesis proteica y de diversas quinasas, 24 hs después del entrenamiento no afectan la retención de la memoria 24hs luego (48hs después del entrenamiento) (Debiec et al., 2002; Kelly et al., 2003). Un caso en el que sí se observó un efecto amnésico a las 24hs de interferir con un proceso de mantenimiento es el de PKM ζ , proteína que se postula como uno de los mecanismos enzimáticos sostenidos autónomamente en el tiempo y que mantienen la traza mnésica (sección 1.8, Sacktor, 2008). La inyección del inhibidor de PKM ζ , ZIP, una vez finalizada la ventana de la consolidación de la MLT es amnésico a las pocas horas de su administración y también 24hs luego (revisado en Kwapis and Helmstetter, 2014). Sin embargo, recientemente se ha propuesto que el inhibidor ZIP tiene un efecto inespecífico sobre otras quinasas además de PKM ζ y que este péptido disminuye la actividad neuronal espontánea (Kwapis and Helmstetter, 2014; LeBlancq

et al., 2016), por lo que los resultados observados empleando este inhibidor se han puesto en discusión. Fuera de los resultados observados con el inhibidor inespecífico ZIP, no hay evidencias de que la inhibición de PKM ζ tenga efecto a las 24hs del tratamiento.

Por otro lado, ¿qué habríamos observado si hubiésemos inhibido la expresión de *camk2d* a tiempos más largos? Los trabajos realizados con la proteína PKM ζ muestran que si se la inhibe aún hasta tres meses luego de una experiencia comportamental que induce la formación de una memoria persistente, se observa un efecto amnésico sobre la memoria original (Shema et al., 2009, Shema et al., 2011). Este resultado estaría en línea con una idea que supone que si uno afecta un mecanismo de mantenimiento en cualquier momento luego de la consolidación de la MLT se des-estabiliza la traza original y se pierde la retención de la memoria (Sacktor, 2012). Nosotros, proponemos que el mismo efecto se observaría si se inhibe la expresión de *camk2d* aún varios días después del entrenamiento.

Resumiendo, proponemos que:

- i) La expresión sostenida de *camk2d* es un mecanismo molecular destinado a mantener la traza mnésica de memorias persistentes.
- ii) Interferir con este proceso afectará la retención a tiempos más largos que 24hs.
- iii) Si se afecta la expresión de *camk2d* en cualquier momento luego de la consolidación de la MLT, se perderá la retención de la memoria original.

V.7. DEL ROL DEL HIPOCAMPO EN EL PARADIGMA NOR

Para finalizar, analizaremos la importancia de la estructura hipocampal en la formación y almacenamiento de la memoria de reconocimiento de objetos. A pesar de que existen numerosas evidencias demostrando la participación del hipocampo en este proceso, aún existe cierto debate al respecto. En particular la discusión se centra en el hecho de si el hipocampo desempeña un papel significativo en la memoria de reconocimiento de objetos o si la estructura principal en este tipo de memoria es la corteza peririnal (Albasser et al., 2010; Brown et al., 2012; Brown and Aggleton, 2001).

Nuestros resultados indican que el entrenamiento en el paradigma de NOR indujo cambios en la expresión génica y proteica y que los tratamientos farmacológicos realizados en estas estructuras disrumpieron la MLT así como la pMLT. Estos resultados aportan evidencias contundentes de la participación del hipocampo en la formación y mantenimiento de la memoria de reconocimiento de objetos. Sin

embargo, no podemos descartar que hayan también otras estructuras participando en estos procesos, y que la memoria sea almacenada en estas áreas.

En la actualidad, existe una postura que sostiene que la corteza perirhinal procesaría información vinculada a la identidad del objeto, mientras que el hipocampo procesaría exclusivamente información del contexto en el que se encuentra el objeto. De este modo, el hipocampo no sería necesario para reconocer un objeto en sí, sino para reconocer, por ejemplo, un cambio en su posición o un cambio en el contexto. Si esto fuera así, la intervención en el hipocampo no debería afectar la retención de la memoria en la tarea de NOR empleada aquí, ya que el objeto se reconocería empleando la información codificada en la corteza perirhinal. Sin embargo, claramente, este no fue el caso.

Recientemente, fue propuesta una hipótesis muy interesante que conciliaría las diferencias observadas entre los estudios que destacan la relevancia de la corteza perirhinal en esta tarea y aquellos que han demostrado que el hipocampo también es fundamental para estos procesos. Estos autores proponen que el factor crítico que determina cuando es necesaria una u otra estructura no se encuentra en la información categórica o cualitativa procesada por éstas, sino en la cantidad de información adquirida durante la experiencia comportamental. De este modo, la memoria formada por entrenamientos cortos o débiles en los que se adquiere poca información (probablemente en su mayoría vinculada a características del objeto novedoso), serían dependientes de la corteza perirhinal. Sin embargo, en sesiones o entrenamientos más extendidos, en los que la información adquirida es mayor e involucraría características del objeto pero también del contexto, la información sería dirigida de la corteza perirhinal al hipocampo, donde se asociaría con la información contextual y de este modo, la estructura relevante pasaría a ser el hipocampo (Cohen and Stackman, 2015).

VI. CONCLUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS A FUTURO

A lo largo de esta tesis encontramos que:

- Durante la consolidación de la memoria de largo término, NF- κ B regula la expresión de genes de respuesta inmediata y tardía, más específicamente ZIF268 y CaMKII δ .
- El entrenamiento en la tarea de NOR no induce la expresión proteica de BDNF durante la consolidación de la memoria.
- La expresión proteica de ZIF268 aumenta de manera rápida y transitoria durante la consolidación de la MRO y esta es necesaria para la formación de una MLT.
- Durante la consolidación, el mensajero de CaMKII δ se expresa con una cinética tardía que se sostiene hasta varios días luego de la experiencia comportamental. Su expresión es necesaria para la formación y mantenimiento de MLT persistentes. Esta proteína se encuentra principalmente en dendritas, terminales pre-sinápticas y el núcleo.
- La ocupación nucleosomal en sitios regulatorios del promotor de *camk2d* es un mecanismo dinámico que se ve afectado por la experiencia comportamental hasta varios días luego del entrenamiento.
- Todos estos cambios moleculares se observaron en el hipocampo del ratón, destacando la importancia de esta estructura en el almacenamiento de la memoria de reconocimiento de objetos.

Además de los experimentos que se plantearon en las discusiones y que refinarían aún más nuestro estudio, en el futuro creemos que sería muy interesante estudiar la relación entre estos procesos que afectan la duración de la memoria de largo término y los procesos que tienen lugar en estructuras de la corteza y que participarían de la consolidación sistémica. Por ejemplo, ¿es posible que los cambios de expresión observados para CaMKII δ en el hipocampo hayan contribuido a introducir cambios fisiológicos y moleculares en las estructuras de la corteza que participan de la consolidación sistémica?

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Aarse, J., Herlitz, S., Manahan-Vaughan, D., 2016. The requirement of BDNF for hippocampal synaptic plasticity is experience-dependent. *Hippocampus* 26, 739–751. doi:10.1002/hipo.22555
- Abel, T., Lattal, K.M., 2001. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 180–187.
- Adams, C.C., Workman, J.L., 1995. Binding of disparate transcriptional activators to nucleosomal DNA is inherently cooperative. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1405–1421.
- Aggleton, J.P., 1985. One-trial object recognition by rats. *Q. J. Exp. Psychol. Sect. B* 37, 279–294. doi:10.1080/14640748508401171
- Aggleton, J.P., Brown, M.W., Albasser, M.M., 2012. Contrasting brain activity patterns for item recognition memory and associative recognition memory: insights from immediate-early gene functional imaging. *Neuropsychologia* 50, 3141–3155. doi:10.1016/j.neuropsychologia.2012.05.018
- Aggleton, J.P., Neave, N., Nagle, S., Hunt, P.R., 1995. A comparison of the effects of anterior thalamic, mamillary body and fornix lesions on reinforced spatial alternation. *Behav. Brain Res.* 68, 91–101.
- Ahmed, R., Zha, X., Green, S.H., Dailey, M.E., 2006. Synaptic activity and F-actin coordinately regulate CaMKIIalpha localization to dendritic postsynaptic sites in developing hippocampal slices. *Mol. Cell. Neurosci.* 31, 37–51. doi:10.1016/j.mcn.2005.08.020
- Ahn, H.J., Hernandez, C.M., Levenson, J.M., Lubin, F.D., Liou, H.-C., Sweatt, J.D., 2008. c-Rel, an NF-kappaB family transcription factor, is required for hippocampal long-term synaptic plasticity and memory formation. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 15, 539–549. doi:10.1101/lm.866408
- Akers, R.M., Killackey, H.P., 1978. Organization of corticocortical connections in the parietal cortex of the rat. *J. Comp. Neurol.* 181, 513–537. doi:10.1002/cne.901810305
- Akirav, I., Maroun, M., 2006. Ventromedial prefrontal cortex is obligatory for consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 16, 1759–1765. doi:10.1093/cercor/bhj114
- Alarcón, J.M., Malleret, G., Touzani, K., Vronskaya, S., Ishii, S., Kandel, E.R., Barco, A., 2004. Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP^{+/-} mice: a model for the cognitive deficit in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration. *Neuron* 42, 947–959. doi:10.1016/j.neuron.2004.05.021
- Albasser, M.M., Poirier, G.L., Aggleton, J.P., 2010. Qualitatively different modes of perirhinal-hippocampal engagement when rats explore novel vs. familiar objects as revealed by c-Fos imaging. *Eur. J. Neurosci.* 31, 134–147. doi:10.1111/j.1460-9568.2009.07042.x

- Alberini, C.M., Kandel, E.R., 2015. The regulation of transcription in memory consolidation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a021741. doi:10.1101/cshperspect.a021741
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002. *An Overview of Gene Control.*
- Alonso, M., Vianna, M.R.M., Depino, A.M., Mello e Souza, T., Pereira, P., Szapiro, G., Viola, H., Pitossi, F., Izquierdo, I., Medina, J.H., 2002. BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation. *Hippocampus* 12, 551–560. doi:10.1002/hipo.10035
- Ameen-Ali, K.E., Easton, A., Eacott, M.J., 2015. Moving beyond standard procedures to assess spontaneous recognition memory. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 53, 37–51. doi:10.1016/j.neubiorev.2015.03.013
- Angelov, D., Lenouvel, F., Hans, F., Müller, C.W., Bouvet, P., Bednar, J., Moudrianakis, E.N., Cadet, J., Dimitrov, S., 2004. The histone octamer is invisible when NF-kappaB binds to the nucleosome. *J. Biol. Chem.* 279, 42374–42382. doi:10.1074/jbc.M407235200
- Antunes, M., Biala, G., 2012. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn. Process.* 13, 93–110. doi:10.1007/s10339-011-0430-z
- Ataei, N., Sabzghabae, A.M., Movahedian, A., 2015. Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II is a Ubiquitous Molecule in Human Long-term Memory Synaptic Plasticity: A Systematic Review. *Int. J. Prev. Med.* 6, 88. doi:10.4103/2008-7802.164831
- Awad, S., Al-Haffar, K.M.A., Marashly, Q., Quijada, P., Kunhi, M., Al-Yacoub, N., Wade, F.S., Mohammed, S.F., Al-Dayel, F., Sutherland, G., Assiri, A., Sussman, M., Bers, D., Al-Habeeb, W., Poizat, C., 2015. Control of histone H3 phosphorylation by CaMKII δ in response to haemodynamic cardiac stress. *J. Pathol.* 235, 606–618. doi:10.1002/path.4489
- Bai, L., Morozov, A.V., 2010. Gene regulation by nucleosome positioning. *Trends Genet.* 26, 476–483. doi:10.1016/j.tig.2010.08.003
- Baker, K.B., Kim, J.J., 2002. Effects of Stress and Hippocampal NMDA Receptor Antagonism on Recognition Memory in Rats. *Learn. Mem.* 9, 58–65. doi:10.1101/lm.46102
- Ballaré, C., Zaurin, R., Vicent, G.P., Beato, M., 2013. More help than hindrance: nucleosomes aid transcriptional regulation. *Nucl. Austin Tex* 4, 189–194. doi:10.4161/nucl.25108
- Bangaru, M.L.Y., Meng, J., Kaiser, D.J., Yu, H., Fischer, G., Hogan, Q.H., Hudmon, A., 2015. Differential expression of CaMKII isoforms and overall kinase activity in rat dorsal root ganglia after injury. *Neuroscience* 300, 116–127. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.05.007
- Barker, P.A., 2009. Whither proBDNF? *Nat. Neurosci.* 12, 105–106. doi:10.1038/nn0209-105
- Barnes, P., Thomas, K.L., 2008. Proteolysis of proBDNF Is a Key Regulator in the Formation of Memory. *PLoS ONE* 3. doi:10.1371/journal.pone.0003248

- Baumgärtel, K., Tweedie-Cullen, R.Y., Grossmann, J., Gehrig, P., Livingstone-Zatchej, M., Mansuy, I.M., 2009. Changes in the proteome after neuronal zif268 overexpression. *J. Proteome Res.* 8, 3298–3316. doi:10.1021/pr801000r
- Bayer, K.U., Löhler, J., Schulman, H., Harbers, K., 1999. Developmental expression of the CaM kinase II isoforms: ubiquitous gamma- and delta-CaM kinase II are the early isoforms and most abundant in the developing nervous system. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 70, 147–154.
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Igaz, L.M., Bevilacqua, L.R.M., Izquierdo, I., Medina, J.H., 2007. Persistence of Long-Term Memory Storage Requires a Late Protein Synthesis- and BDNF- Dependent Phase in the Hippocampus. *Neuron* 53, 261–277. doi:10.1016/j.neuron.2006.11.025
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Medina, J.H., 2014a. BDNF and memory processing. *Neuropharmacology* 76 Pt C, 677–683. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.04.024
- Bekinschtein, P., Katche, C., Slipczuk, L., Gonzalez, C., Dorman, G., Cammarota, M., Izquierdo, I., Medina, J.H., 2010. Persistence of long-term memory storage: new insights into its molecular signatures in the hippocampus and related structures. *Neurotox. Res.* 18, 377–385. doi:10.1007/s12640-010-9155-5
- Bekinschtein, P., Kent, B.A., Oomen, C.A., Clemenson, G.D., Gage, F.H., Saksida, L.M., Bussey, T.J., 2014b. Brain-derived neurotrophic factor interacts with adult-born immature cells in the dentate gyrus during consolidation of overlapping memories. *Hippocampus* 24, 905–911. doi:10.1002/hipo.22304
- Bekinschtein, P., Kent, B.A., Oomen, C.A., Clemenson, G.D., Gage, F.H., Saksida, L.M., Bussey, T.J., 2013. BDNF in the dentate gyrus is required for consolidation of “pattern-separated” memories. *Cell Rep.* 5, 759–768. doi:10.1016/j.celrep.2013.09.027
- Bennett, M.K., Erondy, N.E., Kennedy, M.B., 1983. Purification and characterization of a calmodulin-dependent protein kinase that is highly concentrated in brain. *J. Biol. Chem.* 258, 12735–12744.
- Besnard, A., Laroche, S., Caboche, J., 2014. Comparative dynamics of MAPK/ERK signalling components and immediate early genes in the hippocampus and amygdala following contextual fear conditioning and retrieval. *Brain Struct. Funct.* 219, 415–430. doi:10.1007/s00429-013-0505-y
- Bhakar, A.L., Tannis, L.-L., Zeindler, C., Russo, M.P., Jobin, C., Park, D.S., MacPherson, S., Barker, P.A., 2002. Constitutive nuclear factor-kappa B activity is required for central neuron survival. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 8466–8475.
- Bliss, T.V., Collingridge, G.L., 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31–39. doi:10.1038/361031a0
- Boccia, M., Freudenthal, R., Blake, M., de la Fuente, V., Acosta, G., Baratti, C., Romano, A., 2007. Activation of hippocampal nuclear factor-kappa B by retrieval is required for memory reconsolidation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 13436–13445. doi:10.1523/JNEUROSCI.4430-07.2007

- Bond, M., Fabunmi, R.P., Baker, A.H., Newby, A.C., 1998. Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: an absolute requirement for transcription factor NF-kappa B. *FEBS Lett.* 435, 29–34.
- Borghaei, R.C., Rawlings, P.L., Javadi, M., Woloshin, J., 2004. NF-kappaB binds to a polymorphic repressor element in the MMP-3 promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316, 182–188. doi:10.1016/j.bbrc.2004.02.030
- Bourtchouladze, R., Abel, T., Berman, N., Gordon, R., Lapidus, K., Kandel, E.R., 1998. Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 5, 365–374.
- Bourtchouladze, R., Lidge, R., Catapano, R., Stanley, J., Gossweiler, S., Romashko, D., Scott, R., Tully, T., 2003. A mouse model of Rubinstein-Taybi syndrome: defective long-term memory is ameliorated by inhibitors of phosphodiesterase 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 10518–10522. doi:10.1073/pnas.1834280100
- Bozon, B., Davis, S., Laroche, S., 2002. Regulated transcription of the immediate-early gene Zif268: mechanisms and gene dosage-dependent function in synaptic plasticity and memory formation. *Hippocampus* 12, 570–577. doi:10.1002/hipo.10100
- Bozon, B., Kelly, A., Josselyn, S.A., Silva, A.J., Davis, S., Laroche, S., 2003. MAPK, CREB and zif268 are all required for the consolidation of recognition memory. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 358, 805–814. doi:10.1098/rstb.2002.1224
- Brecht, M., 2007. Barrel cortex and whisker-mediated behaviors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 17, 408–416. doi:10.1016/j.conb.2007.07.008
- Bredy, T.W., Wu, H., Crego, C., Zellhoefer, J., Sun, Y.E., Barad, M., 2007. Histone modifications around individual BDNF gene promoters in prefrontal cortex are associated with extinction of conditioned fear. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 14, 268–276. doi:10.1101/lm.500907
- Brown, M.W., Aggleton, J.P., 2001. Recognition memory: What are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 51–61. doi:10.1038/35049064
- Brown, M.W., Banks, P.J., 2015. In search of a recognition memory engram. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 50, 12–28. doi:10.1016/j.neubiorev.2014.09.016
- Brown, M.W., Barker, G.R.I., Aggleton, J.P., Warburton, E.C., 2012. What pharmacological interventions indicate concerning the role of the perirhinal cortex in recognition memory. *Neuropsychologia, Experimental contributions to cognitive neuroscience theories of memory A Special Issue in recognition of the contribution of Andrew Mayes* 50, 3122–3140. doi:10.1016/j.neuropsychologia.2012.07.034
- Brown, T.A., 2002. *Accessing the Genome.*
- Burke, S. n., Maurer, A. p., Hartzell, A. l., Nematollahi, S., Uprety, A., Wallace, J. l., Barnes, C. a., 2012. Representation of three-dimensional objects by the rat perirhinal cortex. *Hippocampus* 22, 2032–2044. doi:10.1002/hipo.22060

- Burke, S.N., Barnes, C.A., 2015. The neural representation of 3-dimensional objects in rodent memory circuits. *Behav. Brain Res.* 285, 60–66. doi:10.1016/j.bbr.2014.09.001
- Cairns, B.R., 2007. Chromatin remodeling: insights and intrigue from single-molecule studies. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 989–996. doi:10.1038/nsmb1333
- Callaghan, C.K., Kelly, Á.M., 2012. Differential BDNF signaling in dentate gyrus and perirhinal cortex during consolidation of recognition memory in the rat. *Hippocampus* 22, 2127–2135. doi:10.1002/hipo.22033
- Cammarota, M., Bernabeu, R., Izquierdo, I., Medina, J.H., 1996. Reversible Changes in Hippocampal 3H-AMPA Binding Following Inhibitory Avoidance Training in the Rat. *Neurobiol. Learn. Mem.* 66, 85–88. doi:10.1006/nlme.1996.0046
- Cammarota, M., Bernabeu, R., Levi De Stein, M., Izquierdo, I., Medina, J.H., 1998. Learning-specific, time-dependent increases in hippocampal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II activity and AMPA GluR1 subunit immunoreactivity. *Eur. J. Neurosci.* 10, 2669–2676.
- Cao, X., Wang, H., Mei, B., An, S., Yin, L., Wang, L.P., Tsien, J.Z., 2008. Inducible and selective erasure of memories in the mouse brain via chemical-genetic manipulation. *Neuron* 60, 353–366. doi:10.1016/j.neuron.2008.08.027
- Carayol, N., Chen, J., Yang, F., Jin, T., Jin, L., States, D., Wang, C.-Y., 2006. A dominant function of IKK/NF-kappaB signaling in global lipopolysaccharide-induced gene expression. *J. Biol. Chem.* 281, 31142–31151. doi:10.1074/jbc.M603417200
- Castellucci, V.F., Blumenfeld, H., Goelet, P., Kandel, E.R., 1989. Inhibitor of protein synthesis blocks long-term behavioral sensitization in the isolated gill-withdrawal reflex of *Aplysia*. *J. Neurobiol.* 20, 1–9. doi:10.1002/neu.480200102
- Chen, J., Raj, N., Kim, P., Andrejko, K.M., Deutschman, C.S., 2001. Intrahepatic nuclear factor-kappa B activity and alpha 1-acid glycoprotein transcription do not predict outcome after cecal ligation and puncture in the rat. *Crit. Care Med.* 29, 589–596.
- Chen, L., Mu, Y., Greene, W.C., 2002. Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF-kappaB. *EMBO J.* 21, 6539–6548.
- Chereji, R.V., Morozov, A.V., 2015. Functional roles of nucleosome stability and dynamics. *Brief. Funct. Genomics* 14, 50–60. doi:10.1093/bfpg/elu038
- Cohen, S.J., Stackman, R.W., 2015. Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. *Behav. Brain Res.* 285, 105–117. doi:10.1016/j.bbr.2014.08.002
- Colbran, R.J., Soderling, T.R., 1990. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Curr. Top. Cell. Regul.* 31, 181–221.
- Cooper, S.J., 2005. Donald O. Hebb's synapse and learning rule: a history and commentary. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28, 851–874. doi:10.1016/j.neubiorev.2004.09.009

- Coultrap, S.J., Bayer, K.U., 2012. CaMKII regulation in information processing and storage. *Trends Neurosci.* 35, 607–618. doi:10.1016/j.tins.2012.05.003
- Crick, F., 1984. Memory and molecular turnover. *Nature* 312, 101.
- Cross, L., Brown, M.W., Aggleton, J.P., Warburton, E.C., 2012. The medial dorsal thalamic nucleus and the medial prefrontal cortex of the rat function together to support associative recognition and recency but not item recognition. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 20, 41–50. doi:10.1101/lm.028266.112
- Cunha, C., Brambilla, R., Thomas, K.L., 2010. A simple role for BDNF in learning and memory? *Front. Mol. Neurosci.* 3, 1. doi:10.3389/neuro.02.001.2010
- Davis, H.P., Squire, L.R., 1984. Protein synthesis and memory: a review. *Psychol. Bull.* 96, 518–559.
- de la Fuente, V., Federman, N., Fustiñana, M.S., Zalcmán, G., Romano, A., 2014. Calcineurin phosphatase as a negative regulator of fear memory in hippocampus: control on nuclear factor- κ B signaling in consolidation and reconsolidation. *Hippocampus* 24, 1549–1561. doi:10.1002/hipo.22334
- de la Fuente, V., Federman, N., Zalcmán, G., Salles, A., Freudenthal, R., Romano, A., 2015. NF- κ B transcription factor role in consolidation and reconsolidation of persistent memories. *Front. Mol. Neurosci.* 8, 50. doi:10.3389/fnmol.2015.00050
- de la Fuente, V., Freudenthal, R., Romano, A., 2011. Reconsolidation or extinction: transcription factor switch in the determination of memory course after retrieval. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 5562–5573. doi:10.1523/JNEUROSCI.6066-10.2011
- de Ligt, J., Willemsen, M.H., van Bon, B.W.M., Kleefstra, T., Yntema, H.G., Kroes, T., Vulto-van Silfhout, A.T., Koolen, D.A., de Vries, P., Gilissen, C., del Rosario, M., Hoischen, A., Scheffer, H., de Vries, B.B.A., Brunner, H.G., Veltman, J.A., Vissers, L.E.L.M., 2012. Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *N. Engl. J. Med.* 367, 1921–1929. doi:10.1056/NEJMoa1206524
- de Quervain, D.J.-F., Papassotiropoulos, A., 2006. Identification of a genetic cluster influencing memory performance and hippocampal activity in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 4270–4274. doi:10.1073/pnas.0510212103
- Debiec, J., LeDoux, J.E., Nader, K., 2002. Cellular and Systems Reconsolidation in the Hippocampus. *Neuron* 36, 527–538. doi:10.1016/S0896-6273(02)01001-2
- Deckmann, K., Rörsch, F., Geisslinger, G., Grösch, S., 2012. Dimethylcelecoxib induces an inhibitory complex consisting of HDAC1/NF- κ B(p65)RelA leading to transcriptional downregulation of mPGES-1 and EGR1. *Cell. Signal.* 24, 460–467. doi:10.1016/j.cellsig.2011.09.025
- Dere, E., Huston, J.P., De Souza Silva, M.A., 2007. The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 31, 673–704. doi:10.1016/j.neubiorev.2007.01.005

- Deshmukh, S.S., Knierim, J.J., 2013. Influence of local objects on hippocampal representations: Landmark vectors and memory. *Hippocampus* 23, 253–267. doi:10.1002/hipo.22101
- Deshmukh, S.S., Knierim, J.J., 2011. Representation of Non-Spatial and Spatial Information in the Lateral Entorhinal Cortex. *Front. Behav. Neurosci.* 5. doi:10.3389/fnbeh.2011.00069
- Dieni, S., Matsumoto, T., Dekkers, M., Rauskolb, S., Ionescu, M.S., Deogracias, R., Gundelfinger, E.D., Kojima, M., Nestel, S., Frotscher, M., Barde, Y.-A., 2012. BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons. *J. Cell Biol.* 196, 775–788. doi:10.1083/jcb.201201038
- Ding, H.K., Teixeira, C.M., Frankland, P.W., 2008. Inactivation of the anterior cingulate cortex blocks expression of remote, but not recent, conditioned taste aversion memory. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 15, 290–293. doi:10.1101/lm.905008
- Dong, J., Jimi, E., Zhong, H., Hayden, M.S., Ghosh, S., 2008. Repression of gene expression by unphosphorylated NF-kappaB p65 through epigenetic mechanisms. *Genes Dev.* 22, 1159–1173. doi:10.1101/gad.1657408
- Dragunow, M., Beilharz, E., Mason, B., Lawlor, P., Abraham, W., Gluckman, P., 1993. Brain-derived neurotrophic factor expression after long-term potentiation. *Neurosci. Lett.* 160, 232–236.
- Dudai, Y., 2002. Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 211–216.
- Eichenbaum, H., Yonelinas, A.P., Ranganath, C., 2007. The medial temporal lobe and recognition memory. *Annu. Rev. Neurosci.* 30, 123–152. doi:10.1146/annurev.neuro.30.051606.094328
- Elgersma, Y., Sweatt, J.D., Giese, K.P., 2004. Mouse genetic approaches to investigating calcium/calmodulin-dependent protein kinase II function in plasticity and cognition. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 8410–8415. doi:10.1523/JNEUROSCI.3622-04.2004
- Ennaceur, A., 2010. One-trial object recognition in rats and mice: Methodological and theoretical issues. *Behav. Brain Res., Special issue on episodic memory* 215, 244–254. doi:10.1016/j.bbr.2009.12.036
- Ennaceur, A., Delacour, J., 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav. Brain Res.* 31, 47–59. doi:10.1016/0166-4328(88)90157-X
- Federman, N., de la Fuente, V., Zalcmán, G., Corbi, N., Onori, A., Passananti, C., Romano, A., 2013. Nuclear factor κ B-dependent histone acetylation is specifically involved in persistent forms of memory. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 7603–7614. doi:10.1523/JNEUROSCI.4181-12.2013
- Federman, N., Fustiñana, M.S., Romano, A., 2012. Reconsolidation involves histone acetylation depending on the strength of the memory. *Neuroscience* 219, 145–156. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.05.057

- Field, Y., Kaplan, N., Fondufe-Mittendorf, Y., Moore, I.K., Sharon, E., Lubling, Y., Widom, J., Segal, E., 2008. Distinct modes of regulation by chromatin encoded through nucleosome positioning signals. *PLoS Comput. Biol.* 4, e1000216. doi:10.1371/journal.pcbi.1000216
- Fioriti, L., Myers, C., Huang, Y.-Y., Li, X., Stephan, J.S., Trifilieff, P., Colnaghi, L., Kosmidis, S., Drisaldi, B., Pavlopoulos, E., Kandel, E.R., 2015. The Persistence of Hippocampal-Based Memory Requires Protein Synthesis Mediated by the Prion-like Protein CPEB3. *Neuron* 86, 1433–1448. doi:10.1016/j.neuron.2015.05.021
- Fischer, A., Sananbenesi, F., Wang, X., Dobbin, M., Tsai, L.-H., 2007. Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature* 447, 178–182. doi:10.1038/nature05772
- Fitzsimons, H.L., Schwartz, S., Given, F.M., Scott, M.J., 2013. The histone deacetylase HDAC4 regulates long-term memory in *Drosophila*. *PLoS One* 8, e83903. doi:10.1371/journal.pone.0083903
- Frankland, P.W., Bontempi, B., 2005. The organization of recent and remote memories. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 119–130. doi:10.1038/nrn1607
- Frankland, P.W., Bontempi, B., Talton, L.E., Kaczmarek, L., Silva, A.J., 2004. The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science* 304, 881–883. doi:10.1126/science.1094804
- Freeman, F.M., Rose, S.P., Scholey, A.B., 1995. Two time windows of anisomycin-induced amnesia for passive avoidance training in the day-old chick. *Neurobiol. Learn. Mem.* 63, 291–295. doi:10.1006/nlme.1995.1034
- Freudenthal, R., Boccia, M.M., Acosta, G.B., Blake, M.G., Merlo, E., Baratti, C.M., Romano, A., 2005. NF- κ B transcription factor is required for inhibitory avoidance long-term memory in mice. *Eur. J. Neurosci.* 21, 2845–2852. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04126.x
- Freudenthal, R., Romano, A., 2000. Participation of Rel/NF- κ B transcription factors in long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Brain Res.* 855, 274–281. doi:10.1016/S0006-8993(99)02358-6
- Furini, C.R., Rossato, J.I., Bitencourt, L.L., Medina, J.H., Izquierdo, I., Cammarota, M., 2010. Beta-adrenergic receptors link NO/sGC/PKG signaling to BDNF expression during the consolidation of object recognition long-term memory. *Hippocampus* 20, 672–683. doi:10.1002/hipo.20656
- Fustiñana, M.S., de la Fuente, V., Federman, N., Freudenthal, R., Romano, A., 2014. Protein degradation by ubiquitin-proteasome system in formation and labilization of contextual conditioning memory. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 21, 478–487. doi:10.1101/lm.035998.114
- Gaertner, T.R., Kolodziej, S.J., Wang, D., Kobayashi, R., Koomen, J.M., Stoops, J.K., Waxham, M.N., 2004. Comparative Analyses of the Three-dimensional Structures and Enzymatic Properties of α , β , γ , and δ Isoforms of Ca²⁺-Calmodulin-dependent Protein Kinase II. *J. Biol. Chem.* 279, 12484–12494. doi:10.1074/jbc.M313597200

- Gangopadhyay, S.S., Barber, A.L., Gallant, C., Grabarek, Z., Smith, J.L., Morgan, K.G., 2003. Differential functional properties of calmodulin-dependent protein kinase II gamma variants isolated from smooth muscle. *Biochem. J.* 372, 347–357. doi:10.1042/bj20030015
- Ghosh, S., Reuveni, I., Barkai, E., Lamprecht, R., 2015. CaMKII activity is required for maintaining learning-induced enhancement of AMPAR-mediated synaptic excitation. *J. Neurochem.* doi:10.1111/jnc.13505
- Giese, K.P., Mizuno, K., 2013. The roles of protein kinases in learning and memory. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 20, 540–552. doi:10.1101/lm.028449.112
- Glanzman, D.L., Kandel, E.R., Schacher, S., 1990. Target-dependent structural changes accompanying long-term synaptic facilitation in *Aplysia* neurons. *Science* 249, 799–802.
- Glowinski, J., Iversen, L., 1966. Regional studies of catecholamines in the rat brain. 3. Subcellular distribution of endogenous and exogenous catecholamines in various brain regions. *Biochem. Pharmacol.* 15, 977–987.
- Gräff, J., Woldemichael, B.T., Berchtold, D., Dewarrat, G., Mansuy, I.M., 2012. Dynamic histone marks in the hippocampus and cortex facilitate memory consolidation. *Nat. Commun.* 3, 991. doi:10.1038/ncomms1997
- Gray, C.B.B., Heller Brown, J., 2014. CaMKII delta subtypes: localization and function. *Front. Pharmacol.* 5, 15. doi:10.3389/fphar.2014.00015
- Gruart, A., Muñoz, M.D., Delgado-García, J.M., 2006. Involvement of the CA3-CA1 synapse in the acquisition of associative learning in behaving mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 1077–1087. doi:10.1523/JNEUROSCI.2834-05.2006
- Guan, J.-S., Haggarty, S.J., Giacometti, E., Dannenberg, J.-H., Joseph, N., Gao, J., Nieland, T.J.F., Zhou, Y., Wang, X., Mazitschek, R., Bradner, J.E., DePinho, R.A., Jaenisch, R., Tsai, L.-H., 2009. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature* 459, 55–60. doi:10.1038/nature07925
- Guan, J.-S., Xie, H., Ding, X., 2015. The role of epigenetic regulation in learning and memory. *Exp. Neurol.* 268, 30–36. doi:10.1016/j.expneurol.2014.05.006
- Guerrini, L., Blasi, F., Denis-Donini, S., 1995. Synaptic activation of NF-kappa B by glutamate in cerebellar granule neurons in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 9077–9081.
- Guertin, M.J., Martins, A.L., Siepel, A., Lis, J.T., 2012. Accurate prediction of inducible transcription factor binding intensities in vivo. *PLoS Genet.* 8, e1002610. doi:10.1371/journal.pgen.1002610
- Guzowski, J.F., Setlow, B., Wagner, E.K., McGaugh, J.L., 2001. Experience-Dependent Gene Expression in the Rat Hippocampus after Spatial Learning: A Comparison of the Immediate-Early Genes Arc, c-fos, and zif268. *J. Neurosci.* 21, 5089–5098.
- Hafting, T., Fyhn, M., Molden, S., Moser, M.-B., Moser, E.I., 2005. Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature* 436, 801–806. doi:10.1038/nature03721

- Haijima, A., Ichitani, Y., 2012. Dissociable anterograde amnesic effects of retrosplenial cortex and hippocampal lesions on spontaneous object recognition memory in rats. *Hippocampus* 22, 1868–1875. doi:10.1002/hipo.22021
- Hale, G., Good, M., 2005. Impaired visuospatial recognition memory but normal object novelty detection and relative familiarity judgments in adult mice expressing the APP^{swe} Alzheimer's disease mutation. *Behav. Neurosci.* 119, 884–891. doi:10.1037/0735-7044.119.4.884
- Hammond, R.S., Tull, L.E., Stackman, R.W., 2004. On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 82, 26–34. doi:10.1016/j.nlm.2004.03.005
- Han, M., Grunstein, M., 1988. Nucleosome loss activates yeast downstream promoters in vivo. *Cell* 55, 1137–1145.
- Hanson, P.I., Kapiloff, M.S., Lou, L.L., Rosenfeld, M.G., Schulman, H., 1989. Expression of a multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase and mutational analysis of its autoregulation. *Neuron* 3, 59–70. doi:10.1016/0896-6273(89)90115-3
- Hanson, P.I., Meyer, T., Stryer, L., Schulman, H., 1994. Dual role of calmodulin in autophosphorylation of multifunctional CaM kinase may underlie decoding of calcium signals. *Neuron* 12, 943–956.
- Hebb, D.O., 1949. *The Organization of Behavior*. Taylor & Francis.
- Heese, K., Inoue, N., Sawada, T., 2006. NF-kappaB regulates B-cell-derived nerve growth factor expression. *Cell. Mol. Immunol.* 3, 63–66.
- Heldt, S.A., Stanek, L., Chhatwal, J.P., Ressler, K.J., 2007. Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Mol. Psychiatry* 12, 656–670. doi:10.1038/sj.mp.4001957
- Hell, J.W., 2014. CaMKII: claiming center stage in postsynaptic function and organization. *Neuron* 81, 249–265. doi:10.1016/j.neuron.2013.12.024
- Hermeijer, G., Mahlke, C., Gutzmann, J.J., Schreiber, J., Blüthgen, N., Kuhl, D., 2013. Genome-wide profiling of the activity-dependent hippocampal transcriptome. *PloS One* 8, e76903. doi:10.1371/journal.pone.0076903
- Hindley, E.L., Nelson, A.J.D., Aggleton, J.P., Vann, S.D., 2014. Dysgranular retrosplenial cortex lesions in rats disrupt cross-modal object recognition. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 21, 171–179. doi:10.1101/lm.032516.113
- Ho, J.W.-T., Narduzzo, K.E., Outram, A., Tinsley, C.J., Henley, J.M., Warburton, E.C., Brown, M.W., 2011. Contributions of area Te2 to rat recognition memory. *Learn. Mem.* 18, 493–501. doi:10.1101/lm.2167511
- Hu, J.-H., Ma, Y.-H., Jiang, J., Yang, N., Duan, S., Jiang, Z.-H., Mei, Z.-T., Fei, J., Guo, L.-H., 2004. Cognitive impairment in mice over-expressing gamma-aminobutyric acid transporter 1 (GAT1). *Neuroreport* 15, 9–12.

- Huang, H., Jiang, L., Li, S., Deng, J., Li, Y., Yao, J., Li, B., Zheng, J., 2014. Using microfluidic chip to form brain-derived neurotrophic factor concentration gradient for studying neuron axon guidance. *Biomicrofluidics* 8, 14108. doi:10.1063/1.4864235
- Huijgen, J., Samson, S., 2015. The hippocampus: A central node in a large-scale brain network for memory. *Rev. Neurol. (Paris)* 171, 204–216. doi:10.1016/j.neurol.2015.01.557
- IDT, I.D.T., 2011. Designing Antisense Oligonucleotides [WWW Document]. URL <https://www.idtdna.com/pages/docs/default-source/technical-reports/designing-antisense-oligonucleotides.pdf>
- Igaz, L.M., Bekinschtein, P., Izquierdo, I., Medina, J.H., 2004. One-trial aversive learning induces late changes in hippocampal CaMKIIalpha, Homer 1a, Syntaxin 1a and ERK2 protein levels. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 132, 1–12. doi:10.1016/j.molbrainres.2004.08.016
- 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. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 6781–6789. doi:20026642
- Irvine, E.E., von Herten, L.S.J., Plattner, F., Giese, K.P., 2006. alphaCaMKII autophosphorylation: a fast track to memory. *Trends Neurosci.* 29, 459–465. doi:10.1016/j.tins.2006.06.009
- James, A.B., Conway, A.-M., Morris, B.J., 2006. Regulation of the neuronal proteasome by Zif268 (Egr1). *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 1624–1634. doi:10.1523/JNEUROSCI.4199-05.2006
- James, Conway, Morris, 2005. Genomic profiling of the neuronal target genes of the plasticity-related transcription factor – Zif268. *J. Neurochem.* 95, 796–810. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03400.x
- Jarome, T.J., Werner, C.T., Kwapis, J.L., Helmstetter, F.J., 2011. Activity dependent protein degradation is critical for the formation and stability of fear memory in the amygdala. *PLoS One* 6, e24349. doi:10.1371/journal.pone.0024349
- Jiang, C., Pugh, B.F., 2009. Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. *Nat. Rev. Genet.* 10, 161–172. doi:10.1038/nrg2522
- Josselyn, S.A., Köhler, S., Frankland, P.W., 2015. Finding the engram. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 521–534. doi:10.1038/nrn4000
- Juo, P., Kaplan, J.M., 2004. The anaphase-promoting complex regulates the abundance of GLR-1 glutamate receptors in the ventral nerve cord of *C. elegans*. *Curr. Biol. CB* 14, 2057–2062. doi:10.1016/j.cub.2004.11.010
- Kaang, B.-K., Choi, J.-H., 2012. Synaptic protein degradation in memory reorganization. *Adv. Exp. Med. Biol.* 970, 221–240. doi:10.1007/978-3-7091-0932-8_10
- Kaltschmidt, B., Kaltschmidt, C., 2015. NF-KappaB in Long-Term Memory and Structural Plasticity in the Adult Mammalian Brain. *Front. Mol. Neurosci.* 8, 69. doi:10.3389/fnmol.2015.00069

- Kaltschmidt, B., Ndiaye, D., Korte, M., Pothion, S., Arbibe, L., Prüllage, M., Pfeiffer, J., Lindecke, A., Staiger, V., Israël, A., Kaltschmidt, C., Mémet, S., 2006. NF-kappaB regulates spatial memory formation and synaptic plasticity through protein kinase A/CREB signaling. *Mol. Cell. Biol.* 26, 2936–2946. doi:10.1128/MCB.26.8.2936-2946.2006
- Kaltschmidt, B., Widera, D., Kaltschmidt, C., 2005. Signaling via NF-kappaB in the nervous system. *Biochim. Biophys. Acta* 1745, 287–299. doi:10.1016/j.bbamcr.2005.05.009
- Kaltschmidt, C., Kaltschmidt, B., Baeuerle, P.A., 1993. Brain synapses contain inducible forms of the transcription factor NF-kappa B. *Mech. Dev.* 43, 135–147.
- Kandel, E.R., 2001. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294, 1030–1038. doi:10.1126/science.1067020
- Katche, C., Bekinschtein, P., Slipczuk, L., Goldin, A., Izquierdo, I.A., Cammarota, M., Medina, J.H., 2010. Delayed wave of c-Fos expression in the dorsal hippocampus involved specifically in persistence of long-term memory storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 349–354. doi:10.1073/pnas.0912931107
- Katche, C., Goldin, A., Gonzalez, C., Bekinschtein, P., Medina, J.H., 2012a. Maintenance of long-term memory storage is dependent on late posttraining Egr-1 expression. *Neurobiol. Learn. Mem.* 98, 220–227. doi:10.1016/j.nlm.2012.08.001
- Katche, C., Goldin, A., Gonzalez, C., Bekinschtein, P., Medina, J.H., 2012b. Maintenance of long-term memory storage is dependent on late posttraining Egr-1 expression. *Neurobiol. Learn. Mem.* 98, 220–227. doi:10.1016/j.nlm.2012.08.001
- Kayne, P.S., Kim, U.J., Han, M., Mullen, J.R., Yoshizaki, F., Grunstein, M., 1988. Extremely conserved histone H4 N terminus is dispensable for growth but essential for repressing the silent mating loci in yeast. *Cell* 55, 27–39.
- Kelly, Á., Laroche, S., Davis, S., 2003. Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase in Hippocampal Circuitry Is Required for Consolidation and Reconsolidation of Recognition Memory. *J. Neurosci.* 23, 5354–5360.
- Kemp, A., Manahan-Vaughan, D., 2004. Hippocampal long-term depression and long-term potentiation encode different aspects of novelty acquisition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 8192–8197. doi:10.1073/pnas.0402650101
- Kesner, R.P., Ravindranathan, A., Jackson, P., Giles, R., Chiba, A.A., 2001. A neural circuit analysis of visual recognition memory: role of perirhinal, medial, and lateral entorhinal cortex. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 8, 87–95. doi:10.1101/lm.29401
- Kinnavane, L., Albasser, M.M., Aggleton, J.P., 2015. Advances in the behavioural testing and network imaging of rodent recognition memory. *Behav. Brain Res.* 285, 67–78. doi:10.1016/j.bbr.2014.07.049
- Kireeva, M.L., Walter, W., Tchernajenko, V., Bondarenko, V., Kashlev, M., Studitsky, V.M., 2002. Nucleosome remodeling induced by RNA polymerase II: loss of the H2A/H2B dimer during transcription. *Mol. Cell* 9, 541–552.

- Kirk, R.E., 2012. *Experimental Design: Procedures for the Behavioral Sciences*, 4th ed. edition. ed. SAGE Publications, Inc, Thousand Oaks.
- Knezetic, J.A., Luse, D.S., 1986. The presence of nucleosomes on a DNA template prevents initiation by RNA polymerase II in vitro. *Cell* 45, 95–104.
- Koppel, I., Timmusk, T., 2013. Differential regulation of Bdnf expression in cortical neurons by class-selective histone deacetylase inhibitors. *Neuropharmacology* 75, 106–115. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.07.015
- Korzus, E., Rosenfeld, M.G., Mayford, M., 2004. CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation. *Neuron* 42, 961–972. doi:10.1016/j.neuron.2004.06.002
- Kovács, K.J., 2008. Measurement of Immediate-Early Gene Activation- c-fos and Beyond. *J. Neuroendocrinol.* 20, 665–672. doi:10.1111/j.1365-2826.2008.01734.x
- Kropff, E., Carmichael, J.E., Moser, M.-B., Moser, E.I., 2015. Speed cells in the medial entorhinal cortex. *Nature* 523, 419–424. doi:10.1038/nature14622
- Kubik, S., Miyashita, T., Guzowski, J.F., 2007. Using immediate-early genes to map hippocampal subregional functions. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 14, 758–770. doi:10.1101/lm.698107
- Kwapis, J.L., Helmstetter, F.J., 2014. Does PKM(zeta) maintain memory? *Brain Res. Bull.* 105, 36–45. doi:10.1016/j.brainresbull.2013.09.005
- Lanahan, A., Worley, P., 1998. Immediate-Early Genes and Synaptic Function. *Neurobiol. Learn. Mem.* 70, 37–43. doi:10.1006/nlme.1998.3836
- LeBlancq, M.J., McKinney, T.L., Dickson, C.T., 2016. ZIP It: Neural Silencing Is an Additional Effect of the PKM-Zeta Inhibitor Zeta-Inhibitory Peptide. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 36, 6193–6198. doi:10.1523/JNEUROSCI.4563-14.2016
- Lee, A.M., Kanter, B.R., Wang, D., Lim, J.P., Zou, M.E., Qiu, C., McMahon, T., Dadgar, J., Fischbach-Weiss, S.C., Messing, R.O., 2013. Prkcz null mice show normal learning and memory. *Nature* 493, 416–419. doi:10.1038/nature11803
- Lee, J.L.C., Everitt, B.J., Thomas, K.L., 2004. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science* 304, 839–843. doi:10.1126/science.1095760
- Lee, J.L.C., Milton, A.L., Everitt, B.J., 2006. Cue-Induced Cocaine Seeking and Relapse Are Reduced by Disruption of Drug Memory Reconsolidation. *J. Neurosci.* 26, 5881–5887. doi:10.1523/JNEUROSCI.0323-06.2006
- Leinwand, S.G., Chalasani, S.H., 2011. Olfactory networks: from sensation to perception. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21, 806–811. doi:10.1016/j.gde.2011.07.006
- 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. *J. Biol. Chem.* 279, 40545–40559. doi:10.1074/jbc.M402229200

- Levenson, J.M., Sweatt, J.D., 2005. Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 108–118. doi:10.1038/nrn1604
- Li, B., Carey, M., Workman, J.L., 2007. The Role of Chromatin during Transcription. *Cell* 128, 707–719. doi:10.1016/j.cell.2007.01.015
- Ling, D.S.F., Benardo, L.S., Serrano, P.A., Blace, N., Kelly, M.T., Crary, J.F., Sacktor, T.C., 2002. Protein kinase Mzeta is necessary and sufficient for LTP maintenance. *Nat. Neurosci.* 5, 295–296. doi:10.1038/nrn829
- Lipsky, R.H., Xu, K., Zhu, D., Kelly, C., Terhakopian, A., Novelli, A., Marini, A.M., 2001. Nuclear factor kappaB is a critical determinant in N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neuroprotection. *J. Neurochem.* 78, 254–264.
- Lisman, J., Schulman, H., Cline, H., 2002. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 175–190. doi:10.1038/nrn753
- Little, G.H., Bai, Y., Williams, T., Poizat, C., 2007. Nuclear calcium/calmodulin-dependent protein kinase IIdelta preferentially transmits signals to histone deacetylase 4 in cardiac cells. *J. Biol. Chem.* 282, 7219–7231. doi:10.1074/jbc.M604281200
- Liu, X., Jones, E.G., 1997. Alpha isoform of calcium-calmodulin dependent protein kinase II (CAM II kinase-alpha) restricted to excitatory synapses in the CA1 region of rat hippocampus. *Neuroreport* 8, 1475–1479.
- Liu, X.B., Jones, E.G., 1996. Localization of alpha type II calcium calmodulin-dependent protein kinase at glutamatergic but not gamma-aminobutyric acid (GABAergic) synapses in thalamus and cerebral cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 7332–7336.
- Liu, X.-B., Murray, K.D., 2012. Neuronal excitability and calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II: location, location, location. *Epilepsia* 53 Suppl 1, 45–52. doi:10.1111/j.1528-1167.2012.03474.x
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J., 2000. Regulation of Transcription Initiation.
- Lone, I.N., Shukla, M.S., Charles Richard, J.L., Peshev, Z.Y., Dimitrov, S., Angelov, D., 2013. Binding of NF- κ B to nucleosomes: effect of translational positioning, nucleosome remodeling and linker histone H1. *PLoS Genet.* 9, e1003830. doi:10.1371/journal.pgen.1003830
- López, A.J., Wood, M.A., 2015a. Role of nucleosome remodeling in neurodevelopmental and intellectual disability disorders. *Front. Behav. Neurosci.* 9, 100. doi:10.3389/fnbeh.2015.00100
- López, A.J., Wood, M.A., 2015b. Role of nucleosome remodeling in neurodevelopmental and intellectual disability disorders. *Front. Behav. Neurosci.* 9. doi:10.3389/fnbeh.2015.00100
- Lorch, Y., LaPointe, J.W., Kornberg, R.D., 1987. Nucleosomes inhibit the initiation of transcription but allow chain elongation with the displacement of histones. *Cell* 49, 203–210.

- Lu, F.-M., Hawkins, R.D., 2006. Presynaptic and postsynaptic Ca²⁺ and CamKII contribute to long-term potentiation at synapses between individual CA3 neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 4264–4269. doi:10.1073/pnas.0508162103
- Lubin, F.D., Roth, T.L., Sweatt, J.D., 2008. Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 10576–10586. doi:10.1523/JNEUROSCI.1786-08.2008
- Lubin, F.D., Sweatt, J.D., 2007. The I κ B kinase regulates chromatin structure during reconsolidation of conditioned fear memories. *Neuron* 55, 942–957. doi:10.1016/j.neuron.2007.07.039
- Lucchesi, W., Mizuno, K., Giese, K.P., 2011. Novel insights into CaMKII function and regulation during memory formation. *Brain Res. Bull.* 85, 2–8. doi:10.1016/j.brainresbull.2010.10.009
- Ma, H., Groth, R.D., Cohen, S.M., Emery, J.F., Li, B.-X., Hoedt, E., Zhang, G.-A., Neubert, T.A., Tsien, R.W., 2014. γ CaMKII shuttles Ca²⁺/CaM to the nucleus to trigger CREB phosphorylation and gene expression. *Cell* 159, 281–294. doi:10.1016/j.cell.2014.09.019
- Ma, Y.L., Wang, H.L., Wu, H.C., Wei, C.L., Lee, E.H., 1998. Brain-derived neurotrophic factor antisense oligonucleotide impairs memory retention and inhibits long-term potentiation in rats. *Neuroscience* 82, 957–967.
- Maccarrone, M., Valverde, O., Barbaccia, M.L., Castañé, A., Maldonado, R., Ledent, C., Parmentier, M., Finazzi-Agrò, A., 2002. Age-related changes of anandamide metabolism in CB1 cannabinoid receptor knockout mice: correlation with behaviour. *Eur. J. Neurosci.* 15, 1178–1186.
- Maddox, S.A., Monsey, M.S., Schafe, G.E., 2011. Early growth response gene 1 (Egr-1) is required for new and reactivated fear memories in the lateral amygdala. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 18, 24–38. doi:10.1101/lm.1980211
- Maldonado, 2008. *La memoria animal. Adquisición, persistencia y olvido.* Editorial Eudeba, Buenos Aires.
- Malkani, S., Rosen, J.B., 2000. Specific induction of early growth response gene 1 in the lateral nucleus of the amygdala following contextual fear conditioning in rats. *Neuroscience* 97, 693–702.
- Manns, J.R., Eichenbaum, H., 2009. A cognitive map for object memory in the hippocampus. *Learn. Mem.* 16, 616–624. doi:10.1101/lm.1484509
- Maroun, M., Akirav, I., 2008. Arousal and stress effects on consolidation and reconsolidation of recognition memory. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 33, 394–405. doi:10.1038/sj.npp.1301401
- Martin, S.J., Grimwood, P.D., Morris, R.G., 2000. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu. Rev. Neurosci.* 23, 649–711. doi:10.1146/annurev.neuro.23.1.649

- Matsumoto, T., Rauskolb, S., Polack, M., Klose, J., Kolbeck, R., Korte, M., Barde, Y.-A., 2008. Biosynthesis and processing of endogenous BDNF: CNS neurons store and secrete BDNF, not pro-BDNF. *Nat. Neurosci.* 11, 131–133. doi:10.1038/nn2038
- Mattson, M.P., Meffert, M.K., 2006. Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death Differ.* 13, 852–860. doi:10.1038/sj.cdd.4401837
- Maurice, T., Duclot, F., Meunier, J., Naert, G., Givalois, L., Meffre, J., Célérier, A., Jacquet, C., Copois, V., Mechti, N., Ozato, K., Gongora, C., 2008. Altered memory capacities and response to stress in p300/CBP-associated factor (PCAF) histone acetylase knockout mice. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 33, 1584–1602. doi:10.1038/sj.npp.1301551
- Mayer, P., Möhlig, M., Idlibe, D., Pfeiffer, A., 1995. Novel and uncommon isoforms of the calcium sensing enzyme calcium/calmodulin dependent protein kinase II in heart tissue. *Basic Res. Cardiol.* 90, 372–379.
- Mayer, P., Möhlig, M., Schatz, H., Pfeiffer, A., 1994. Additional isoforms of multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in rat heart tissue. *Biochem. J.* 298, 757–758.
- Mayford, M., Baranes, D., Podsypanina, K., Kandel, E.R., 1996. The 3'-untranslated region of CaMKII alpha is a cis-acting signal for the localization and translation of mRNA in dendrites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 13250–13255.
- Maze, I., Wenderski, W., Noh, K.-M., Bagot, R.C., Tzavaras, N., Purushothaman, I., Elsässer, S.J., Guo, Y., Ionete, C., Hurd, Y.L., Tamminga, C.A., Halene, T., Farrelly, L., Soshnev, A.A., Wen, D., Rafii, S., Birtwistle, M.R., Akbarian, S., Buchholz, B.A., Blitzer, R.D., Nestler, E.J., Yuan, Z.-F., Garcia, B.A., Shen, L., Molina, H., Allis, C.D., 2015. Critical Role of Histone Turnover in Neuronal Transcription and Plasticity. *Neuron* 87, 77–94. doi:10.1016/j.neuron.2015.06.014
- McGaugh, J.L., 2000. Memory--a century of consolidation. *Science* 287, 248–251.
- McGaugh, J.L., 1972. Impairment and facilitation of memory consolidation. *Act. Nerv. Super. (Praha)* 14, 64–74.
- McGaugh, J.L., 1966a. Time-Dependent Processes in Memory Storage. *Science* 153, 1351–1358. doi:10.1126/science.153.3742.1351
- McGaugh, J.L., 1966b. Time-Dependent Processes in Memory Storage. *Science* 153, 1351–1358. doi:10.1126/science.153.3742.1351
- Meagher, R.B., 2014. "Memory and molecular turnover," 30 years after inception. *Epigenetics Chromatin* 7, 37. doi:10.1186/1756-8935-7-37
- Meberg, P.J., Kinney, W.R., Valcourt, E.G., Routtenberg, A., 1996. Gene expression of the transcription factor NF-kappa B in hippocampus: regulation by synaptic activity. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 38, 179–190.
- Meffert, M.K., Baltimore, D., 2005. Physiological functions for brain NF-kappaB. *Trends Neurosci.* 28, 37–43. doi:10.1016/j.tins.2004.11.002

- Meffert, M.K., Chang, J.M., Wiltgen, B.J., Fanselow, M.S., Baltimore, D., 2003. NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior. *Nat. Neurosci.* 6, 1072–1078. doi:10.1038/nn1110
- Mehler, M.F., 2008. Epigenetic principles and mechanisms underlying nervous system functions in health and disease. *Prog. Neurobiol.* 86, 305–341. doi:10.1016/j.pneurobio.2008.10.001
- Mello-Carpes, P.B., da Silva de Vargas, L., Gayer, M.C., Roehrs, R., Izquierdo, I., 2016. Hippocampal noradrenergic activation is necessary for object recognition memory consolidation and can promote BDNF increase and memory persistence. *Neurobiol. Learn. Mem.* 127, 84–92. doi:10.1016/j.nlm.2015.11.014
- Merlo, E., Romano, A., 2008. Memory extinction entails the inhibition of the transcription factor NF-kappaB. *PloS One* 3, e3687. doi:10.1371/journal.pone.0003687
- Merlo, E., Romano, A., 2007. Long-term memory consolidation depends on proteasome activity in the crab *Chasmagnathus*. *Neuroscience* 147, 46–52. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.04.022
- Miller, S., Yasuda, M., Coats, J.K., Jones, Y., Martone, M.E., Mayford, M., 2002. Disruption of dendritic translation of CaMKIIalpha impairs stabilization of synaptic plasticity and memory consolidation. *Neuron* 36, 507–519.
- Mitchell, A.S., Dalrymple-Alford, J.C., 2005. Dissociable memory effects after medial thalamus lesions in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 22, 973–985. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04199.x
- Montarolo, P.G., Goelet, P., Castellucci, V.F., Morgan, J., Kandel, E.R., Schacher, S., 1986. A critical period for macromolecular synthesis in long-term heterosynaptic facilitation in *Aplysia*. *Science* 234, 1249–1254.
- Mori, Y., Imaizumi, K., Katayama, T., Yoneda, T., Tohyama, M., 2000. Two cis-acting elements in the 3' untranslated region of alpha-CaMKII regulate its dendritic targeting. *Nat. Neurosci.* 3, 1079–1084. doi:10.1038/80591
- Morici, J.F., Bekinschtein, P., Weisstaub, N.V., 2015. Medial prefrontal cortex role in recognition memory in rodents. *Behav. Brain Res.* 292, 241–251. doi:10.1016/j.bbr.2015.06.030
- Murer, M.G., Yan, Q., Raisman-Vozari, R., 2001. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 63, 71–124.
- Murray, K.D., Isackson, P.J., Jones, E.G., 2003. N-methyl-D-aspartate receptor dependent transcriptional regulation of two calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II isoforms in rodent cerebral cortex. *Neuroscience* 122, 407–420.
- Nanda, S.A., Mack, K.J., 2000. Seizures and sensory stimulation result in different patterns of brain derived neurotrophic factor protein expression in the barrel cortex and hippocampus. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 78, 1–14.

- Neidl, R., Schneider, A., Bousiges, O., Majchrzak, M., Barbelivien, A., de Vasconcelos, A.P., Dorgans, K., Doussau, F., Loeffler, J.-P., Cassel, J.-C., Boutillier, A.-L., 2016. Late-Life Environmental Enrichment Induces Acetylation Events and Nuclear Factor κ B-Dependent Regulations in the Hippocampus of Aged Rats Showing Improved Plasticity and Learning. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 36, 4351–4361. doi:10.1523/JNEUROSCI.3239-15.2016
- Nelson, A.J.D., Thur, K.E., Marsden, C.A., Cassaday, H.J., 2010. Dissociable roles of dopamine within the core and medial shell of the nucleus accumbens in memory for objects and place. *Behav. Neurosci.* 124, 789–799. doi:10.1037/a0021114
- Nicholls, J.G., 2001. *From Neuron to Brain* (4th Edition). Sinauer Associates, Inc.
- Ninan, I., Arancio, O., 2004. Presynaptic CaMKII Is Necessary for Synaptic Plasticity in Cultured Hippocampal Neurons. *Neuron* 42, 129–141. doi:10.1016/S0896-6273(04)00143-6
- Obin, M., Mescio, E., Gong, X., Haas, A.L., Joseph, J., Taylor, A., 1999. Neurite outgrowth in PC12 cells. Distinguishing the roles of ubiquitylation and ubiquitin-dependent proteolysis. *J. Biol. Chem.* 274, 11789–11795.
- Okuda, S., Roozendaal, B., McGaugh, J.L., 2004. Glucocorticoid effects on object recognition memory require training-associated emotional arousal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 853–858. doi:10.1073/pnas.0307803100
- O'Neill, L.A., Kaltschmidt, C., 1997. NF- κ B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci.* 20, 252–258.
- Opitz, B., 2014. Memory function and the hippocampus. *Front. Neurol. Neurosci.* 34, 51–59. doi:10.1159/000356422
- Orqueda, A.J., Dansey, M.V., Español, A., Veleiro, A.S., Bal de Kier Joffé, E., Sales, M.E., Burton, G., Pecci, A., 2014. The rigid steroid 21-hydroxy-6,19-epoxyprogesterone (21OH-6,19OP) is a dissociated glucocorticoid receptor modulator potentially useful as a novel coadjuvant in breast cancer chemotherapy. *Biochem. Pharmacol.* 89, 526–535. doi:10.1016/j.bcp.2014.04.006
- Ou, L.-C., Gean, P.-W., 2007. Transcriptional regulation of brain-derived neurotrophic factor in the amygdala during consolidation of fear memory. *Mol. Pharmacol.* 72, 350–358. doi:10.1124/mol.107.034934
- Owen-Hughes, T., Workman, J.L., 1996. Remodeling the chromatin structure of a nucleosome array by transcription factor-targeted trans-displacement of histones. *EMBO J.* 15, 4702–4712.
- Parron, C., Save, E., 2004. Comparison of the effects of entorhinal and retrosplenial cortical lesions on habituation, reaction to spatial and non-spatial changes during object exploration in the rat. *Neurobiol. Learn. Mem.* 82, 1–11. doi:10.1016/j.nlm.2004.03.004
- Paxinos, G., Franklin, K.B.J., 2004. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Gulf Professional Publishing.

- Paxinos, G., Puelles, L. (Eds.), 2012. Front Matter A2 - Watson, Charles, in: *The Mouse Nervous System*. Academic Press, San Diego, p. iii.
- Pineda, V.V., Athos, J.I., Wang, H., Celver, J., Ippolito, D., Boulay, G., Birnbaumer, L., Storm, D.R., 2004. Removal of G(ialpha1) constraints on adenylyl cyclase in the hippocampus enhances LTP and impairs memory formation. *Neuron* 41, 153–163.
- Pittenger, C., Huang, Y.Y., Paletzki, R.F., Bourtchouladze, R., Scanlin, H., Vronskaya, S., Kandel, E.R., 2002. Reversible inhibition of CREB/ATF transcription factors in region CA1 of the dorsal hippocampus disrupts hippocampus-dependent spatial memory. *Neuron* 34, 447–462.
- Pollock, G.S., Vernon, E., Forbes, M.E., Yan, Q., Ma, Y.T., Hsieh, T., Robichon, R., Frost, D.O., Johnson, J.E., 2001. Effects of early visual experience and diurnal rhythms on BDNF mRNA and protein levels in the visual system, hippocampus, and cerebellum. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 3923–3931.
- Ponts, N., Harris, E.Y., Lonardi, S., Le Roch, K.G., 2011. Nucleosome occupancy at transcription start sites in the human malaria parasite: a hard-wired evolution of virulence? *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 11, 716–724.
doi:10.1016/j.meegid.2010.08.002
- Poo, M.M., 2001. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 24–32.
doi:10.1038/35049004
- Purves, D., 2003. *Invitación a la neurociencia*. Editorial Médica Panamericana.
- Quevedo, J., Vianna, M.R., Roesler, R., de-Paris, F., Izquierdo, I., Rose, S.P., 1999. Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. *Learn. Mem. Cold Spring Harb.* N 6, 600–607.
- Rattiner, L.M., Davis, M., Ressler, K.J., 2004. Differential regulation of brain-derived neurotrophic factor transcripts during the consolidation of fear learning. *Learn. Mem. Cold Spring Harb.* N 11, 727–731. doi:10.1101/lm.83304
- Reinke, H., Hörz, W., 2003. Histones are first hyperacetylated and then lose contact with the activated PHO5 promoter. *Mol. Cell* 11, 1599–1607.
- Reul, J.M.H.M., 2014. Making memories of stressful events: a journey along epigenetic, gene transcription, and signaling pathways. *Front. Psychiatry* 5, 5.
doi:10.3389/fpsyt.2014.00005
- Riedel, G., Micheau, J., Lam, A.G.M., Roloff, E. v L., Martin, S.J., Bridge, H., Hoz, L. de, Poeschel, B., McCulloch, J., Morris, R.G.M., 1999. Reversible neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes. *Nat. Neurosci.* 2, 898–905.
doi:10.1038/13202
- Romano, A., 2012. NF-κB Transcription Factor: A Model for the Study of Transcription Regulation in Memory Consolidation, Reconsolidation and Extinction, in: Benedict C. Albeni (Ed.), *Transcription Factors CREB and NF-κB: Involvement in Synaptic Plasticity and Memory Formation*. BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, pp. 97–112.

- Romano, A., Locatelli, F., Freudenthal, R., Merlo, E., Feld, M., Ariel, P., Lemos, D., Federman, N., Fustiñana, M.S., 2006. Lessons from a crab: molecular mechanisms in different memory phases of *Chasmagnathus*. *Biol. Bull.* 210, 280–288.
- Rossato, J.I., Bevilaqua, L.R.M., Myskiw, J.C., Medina, J.H., Izquierdo, I., Cammarota, M., 2007. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 14, 36–46. doi:10.1101/lm.422607
- Rossato, J.I., Radiske, A., Kohler, C.A., Gonzalez, C., Bevilaqua, L.R., Medina, J.H., Cammarota, M., 2013. Consolidation of object recognition memory requires simultaneous activation of dopamine D1/D5 receptors in the amygdala and medial prefrontal cortex but not in the hippocampus. *Neurobiol. Learn. Mem.* 106, 66–70. doi:10.1016/j.nlm.2013.07.012
- Rudy, J.W., 2015. Variation in the persistence of memory: An interplay between actin dynamics and AMPA receptors. *Brain Res.* 1621, 29–37. doi:10.1016/j.brainres.2014.12.009
- Sacktor, T.C., 2012. Memory maintenance by PKM ζ --an evolutionary perspective. *Mol. Brain* 5, 31. doi:10.1186/1756-6606-5-31
- Sacktor, T.C., 2008. PKMzeta, LTP maintenance, and the dynamic molecular biology of memory storage. *Prog. Brain Res.* 169, 27–40. doi:10.1016/S0079-6123(07)00002-7
- Sacktor, T.C., Osten, P., Valsamis, H., Jiang, X., Naik, M.U., Sublette, E., 1993. Persistent activation of the zeta isoform of protein kinase C in the maintenance of long-term potentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 8342–8346.
- Saha, R.N., Liu, X., Pahan, K., 2006. Up-regulation of BDNF in astrocytes by TNF-alpha: a case for the neuroprotective role of cytokine. *J. Neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. NeuroImmune Pharmacol.* 1, 212–222. doi:10.1007/s11481-006-9020-8
- Sakata, K., Martinowich, K., Woo, N.H., Schloesser, R.J., Jimenez, D.V., Ji, Y., Shen, L., Lu, B., 2013. Role of activity-dependent BDNF expression in hippocampal-prefrontal cortical regulation of behavioral perseverance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 15103–15108. doi:10.1073/pnas.1222872110
- 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. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.01.063
- Sando, R., Gounko, N., Pieraut, S., Liao, L., Yates, J., Maximov, A., 2012. HDAC4 governs a transcriptional program essential for synaptic plasticity and memory. *Cell* 151, 821–834. doi:10.1016/j.cell.2012.09.037
- Sargolini, F., Fyhn, M., Hafting, T., McNaughton, B.L., Witter, M.P., Moser, M.-B., Moser, E.I., 2006. Conjunctive Representation of Position, Direction, and Velocity in Entorhinal Cortex. *Science* 312, 758–762. doi:10.1126/science.1125572

- Sargolini, F., Roullet, P., Oliverio, A., Mele, A., 2003. Effects of intra-accumbens focal administrations of glutamate antagonists on object recognition memory in mice. *Behav. Brain Res.* 138, 153–163. doi:10.1016/S0166-4328(02)00238-3
- Scanlon, K.J., Ohta, Y., Ishida, H., Kijima, H., Ohkawa, T., Kaminski, A., Tsai, J., Horng, G., Kashani-Sabet, M., 1995. Oligonucleotide-mediated modulation of mammalian gene expression. *FASEB J.* 9, 1288–1296.
- Schlumm, F., Mauceri, D., Freitag, H.E., Bading, H., 2013. Nuclear Calcium Signaling Regulates Nuclear Export of a Subset of Class IIa Histone Deacetylases following Synaptic Activity. *J. Biol. Chem.* 288, 8074–8084. doi:10.1074/jbc.M112.432773
- Schulman, H., Hanson, P.I., Meyer, T., 1992. Decoding calcium signals by multifunctional CaM kinase. *Cell Calcium* 13, 401–411.
- Schwartz, S., Truglio, M., Scott, M.J., Fitzsimons, H.L., 2016. Long-term Memory in *Drosophila* Is Influenced by the Histone Deacetylase HDAC4 Interacting with the SUMO-Conjugating Enzyme Ubc9. *Genetics*. doi:10.1534/genetics.115.183194
- Schworer, C.M., Rothblum, L.I., Thekkumkara, T.J., Singer, H.A., 1993. Identification of novel isoforms of the delta subunit of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. Differential expression in rat brain and aorta. *J. Biol. Chem.* 268, 14443–14449.
- Shema, R., Haramati, S., Ron, S., Hazvi, S., Chen, A., Sacktor, T.C., Dudai, Y., 2011. Enhancement of Consolidated Long-Term Memory by Overexpression of Protein Kinase M ζ in the Neocortex. *Science* 331, 1207–1210. doi:10.1126/science.1200215
- Shema, R., Hazvi, S., Sacktor, T.C., Dudai, Y., 2009. Boundary conditions for the maintenance of memory by PKM ζ in neocortex. *Learn. Mem.* 16, 122–128. doi:10.1101/lm.1183309
- Shen, K., Cowan, C.W., 2010. Guidance Molecules in Synapse Formation and Plasticity. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2. doi:10.1101/cshperspect.a001842
- Shen, K., Meyer, T., 1999. Dynamic control of CaMKII translocation and localization in hippocampal neurons by NMDA receptor stimulation. *Science* 284, 162–166.
- Shen, K., Teruel, M.N., Subramanian, K., Meyer, T., 1998. CaMKIIbeta functions as an F-actin targeting module that localizes CaMKIIalpha/beta heterooligomers to dendritic spines. *Neuron* 21, 593–606.
- Simpson, C.S., Morris, B.J., 2000. Regulation of neuronal cell adhesion molecule expression by NF-kappa B. *J. Biol. Chem.* 275, 16879–16884.
- Sirri, A., Bianchi, V., Pelizzola, M., Mayhaus, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Toniolo, D., D'Adamo, P., 2010. Temporal gene expression profile of the hippocampus following trace fear conditioning. *Brain Res.* 1308, 14–23. doi:10.1016/j.brainres.2009.10.049
- Solstad, T., Boccara, C.N., Kropff, E., Moser, M.-B., Moser, E.I., 2008. Representation of Geometric Borders in the Entorhinal Cortex. *Science* 322, 1865–1868. doi:10.1126/science.1166466

- Soulé, J., Penke, Z., Kanhema, T., Alme, M.N., Laroche, S., Bramham, C.R., 2008. Object-place recognition learning triggers rapid induction of plasticity-related immediate early genes and synaptic proteins in the rat dentate gyrus. *Neural Plast.* 2008, 269097. doi:10.1155/2008/269097
- Speese, S.D., Trotta, N., Rodesch, C.K., Aravamudan, B., Broadie, K., 2003. The ubiquitin proteasome system acutely regulates presynaptic protein turnover and synaptic efficacy. *Curr. Biol.* CB 13, 899–910.
- Squire, L.R., Genzel, L., Wixted, J.T., Morris, R.G., 2015. Memory consolidation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a021766. doi:10.1101/cshperspect.a021766
- Steckler, T., Drinkenburg, W.H., Sahgal, A., Aggleton, J.P., 1998. Recognition memory in rats--II. Neuroanatomical substrates. *Prog. Neurobiol.* 54, 313–332.
- Steckler, T., Drinkenburg, W.H.I.M., Sahgal, A., Aggleton, J.P., 1998. RECOGNITION MEMORY IN RATS—I.CONCEPTS AND CLASSIFICATION. *Prog. Neurobiol.* 54, 289–311. doi:10.1016/S0301-0082(97)00060-9
- Stefanko, D.P., Barrett, R.M., Ly, A.R., Reolon, G.K., Wood, M.A., 2009. Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 9447–9452. doi:10.1073/pnas.0903964106
- Struhl, K., Segal, E., 2013. Determinants of nucleosome positioning. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 267–273. doi:10.1038/nsmb.2506
- Suzuki, T., Mitake, S., Okumura-Noji, K., Yang, J.P., Fujii, T., Okamoto, T., 1997. Presence of NF-kappaB-like and IkappaB-like immunoreactivities in postsynaptic densities. *Neuroreport* 8, 2931–2935.
- Sweatt, J.D., 2009. *Mechanisms of Memory.* Academic Press.
- Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E.A., Grønborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brügger, B., Ringler, P., Müller, S.A., Rammner, B., Gräter, F., Hub, J.S., Groot, B.L.D., Mieskes, G., Moriyama, Y., Klingauf, J., Grubmüller, H., Heuser, J., Wieland, F., Jahn, R., 2006. Molecular Anatomy of a Trafficking Organelle. *Cell* 127, 831–846. doi:10.1016/j.cell.2006.10.030
- Takeuchi, Y., Yamamoto, H., Matsumoto, K., Kimura, T., Katsuragi, S., Miyakawa, T., Miyamoto, E., 1999. Nuclear localization of the delta subunit of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in rat cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* 72, 815–825.
- Teif, V.B., Erdel, F., Beshnova, D.A., Vainshtein, Y., Mallm, J.-P., Rippe, K., 2013. Taking into account nucleosomes for predicting gene expression. *Methods San Diego Calif* 62, 26–38. doi:10.1016/j.ymeth.2013.03.011
- Teixeira, C.M., Pomedli, S.R., Maei, H.R., Kee, N., Frankland, P.W., 2006. Involvement of the anterior cingulate cortex in the expression of remote spatial memory. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 7555–7564. doi:10.1523/JNEUROSCI.1068-06.2006

- Thyss, R., Virolle, V., Imbert, V., Peyron, J.-F., Aberdam, D., Virolle, T., 2005. NF-kappaB/Egr-1/Gadd45 are sequentially activated upon UVB irradiation to mediate epidermal cell death. *EMBO J.* 24, 128–137. doi:10.1038/sj.emboj.7600501
- Tirosh, I., Barkai, N., 2008. Two strategies for gene regulation by promoter nucleosomes. *Genome Res.* 18, 1084–1091. doi:10.1101/gr.076059.108
- Tobimatsu, T., Fujisawa, H., 1989. Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs. *J. Biol. Chem.* 264, 17907–17912.
- Tsao, A., Moser, M.-B., Moser, E.I., 2013. Traces of experience in the lateral entorhinal cortex. *Curr. Biol. CB* 23, 399–405. doi:10.1016/j.cub.2013.01.036
- Tullai, J.W., Schaffer, M.E., Mullenbrock, S., Sholder, G., Kasif, S., Cooper, G.M., 2007. Immediate-early and delayed primary response genes are distinct in function and genomic architecture. *J. Biol. Chem.* 282, 23981–23995. doi:10.1074/jbc.M702044200
- Van Cauter, T., Camon, J., Alvernhe, A., Elduayen, C., Sargolini, F., Save, E., 2013. Distinct roles of medial and lateral entorhinal cortex in spatial cognition. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 23, 451–459. doi:10.1093/cercor/bhs033
- van Strien, N.M., Cappaert, N.L.M., Witter, M.P., 2009. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 272–282. doi:10.1038/nrn2614
- Vann, S.D., Aggleton, J.P., Maguire, E.A., 2009. What does the retrosplenial cortex do? *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 792–802. doi:10.1038/nrn2733
- 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. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 6128–6140. doi:10.1523/JNEUROSCI.0296-07.2007
- Veyrac, A., Besnard, A., Caboche, J., Davis, S., Laroche, S., 2014. Chapter Four - The Transcription Factor Zif268/Egr1, Brain Plasticity, and Memory, in: Muly, Z.U.K. and E.C. (Ed.), *Progress in Molecular Biology and Translational Science, Molecular Basis of Memory*. Academic Press, pp. 89–129.
- Vogel-Ciernia, A., Matheos, D.P., Barrett, R.M., Kramár, E., Azzawi, S., Chen, Y., Magnan, C.N., Zeller, M., Sylvain, A., Haettig, J., Jia, Y., Tran, A., Dang, R., Post, R.J., Chabrier, M., Babayan, A., Wu, J.I., Crabtree, G.R., Baldi, P., Baram, T.Z., Lynch, G., Wood, M.A., 2013. The Neuron-specific Chromatin Regulatory Subunit BAF53b is Necessary for Synaptic Plasticity and Memory. *Nat. Neurosci.* 16, 552–561. doi:10.1038/nn.3359
- Vogel-Ciernia, A., Wood, M.A., 2014. Neuron-specific chromatin remodeling: a missing link in epigenetic mechanisms underlying synaptic plasticity, memory, and intellectual disability disorders. *Neuropharmacology* 80, 18–27. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.10.002

- Volk, L.J., Bachman, J.L., Johnson, R., Yu, Y., Haganir, R.L., 2013. PKM- ζ is not required for hippocampal synaptic plasticity, learning and memory. *Nature* 493, 420–423. doi:10.1038/nature11802
- Waddington, C.H., 1957. *Strategy of the Genes*. New York: MacMillan.
- Walters, B.J., Zovkic, I.B., 2015. Building up and knocking down: an emerging role for epigenetics and proteasomal degradation in systems consolidation. *Neuroscience* 300, 39–52. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.05.005
- Walton, M., Henderson, C., Mason-Parker, S., Lawlor, P., Abraham, W.C., Bilkey, D., Dragunow, M., 1999. Immediate early gene transcription and synaptic modulation. *J. Neurosci. Res.* 58, 96–106.
- Wang, W.-H., Cheng, L.-C., Pan, F.-Y., Xue, B., Wang, D.-Y., Chen, Z., Li, C.-J., 2011. Intracellular trafficking of histone deacetylase 4 regulates long-term memory formation. *Anat. Rec. Hoboken NJ* 2007 294, 1025–1034. doi:10.1002/ar.21389
- Wang, Z.-W., 2008. Regulation of Synaptic Transmission by Presynaptic CaMKII and BK Channels. *Mol. Neurobiol.* 38, 153–166. doi:10.1007/s12035-008-8039-7
- Warburton, E.C., Brown, M.W., 2015. Neural circuitry for rat recognition memory. *Behav. Brain Res.* 285, 131–139. doi:10.1016/j.bbr.2014.09.050
- Wayman, G.A., Lee, Y.-S., Tokumitsu, H., Silva, A.J., Silva, A., Soderling, T.R., 2008. Calmodulin-kinases: modulators of neuronal development and plasticity. *Neuron* 59, 914–931. doi:10.1016/j.neuron.2008.08.021
- Weible, A.P., Rowland, D.C., Monaghan, C.K., Wolfgang, N.T., Kentros, C.G., 2012. Neural Correlates of Long-Term Object Memory in the Mouse Anterior Cingulate Cortex. *J. Neurosci.* 32, 5598–5608. doi:10.1523/JNEUROSCI.5265-11.2012
- West, A.E., Pruunsild, P., Timmusk, T., 2014. Neurotrophins: transcription and translation. *Handb. Exp. Pharmacol.* 220, 67–100. doi:10.1007/978-3-642-45106-5_4
- Winters, B.D., Bussey, T.J., 2005. Glutamate receptors in perirhinal cortex mediate encoding, retrieval, and consolidation of object recognition memory. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 4243–4251. doi:10.1523/JNEUROSCI.0480-05.2005
- Wood, M.A., Attner, M.A., Oliveira, A.M.M., Brindle, P.K., Abel, T., 2006. A transcription factor-binding domain of the coactivator CBP is essential for long-term memory and the expression of specific target genes. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 13, 609–617. doi:10.1101/lm.213906
- Wood, M.A., Kaplan, M.P., Park, A., Blanchard, E.J., Oliveira, A.M.M., Lombardi, T.L., Abel, T., 2005. Transgenic mice expressing a truncated form of CREB-binding protein (CBP) exhibit deficits in hippocampal synaptic plasticity and memory storage. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 12, 111–119. doi:10.1101/lm.86605
- Workman, J.L., Kingston, R.E., 1992. Nucleosome core displacement in vitro via a metastable transcription factor-nucleosome complex. *Science* 258, 1780–1784.

- Xiao, B., Tu, J.C., Worley, P.F., 2000. Homer: a link between neural activity and glutamate receptor function. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 370–374.
- Xiao, H.-S., Huang, Q.-H., Zhang, F.-X., Bao, L., Lu, Y.-J., Guo, C., Yang, L., Huang, W.-J., Fu, G., Xu, S.-H., Cheng, X.-P., Yan, Q., Zhu, Z.-D., Zhang, X., Chen, Z., Han, Z.-G., Zhang, X., 2002. Identification of gene expression profile of dorsal root ganglion in the rat peripheral axotomy model of neuropathic pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 8360–8365. doi:10.1073/pnas.122231899
- Yeh, S.-H., Lin, C.-H., Gean, P.-W., 2004. Acetylation of nuclear factor-kappaB in rat amygdala improves long-term but not short-term retention of fear memory. *Mol. Pharmacol.* 65, 1286–1292. doi:10.1124/mol.65.5.1286
- Yeh, S.-H., Lin, C.-H., Lee, C.-F., Gean, P.-W., 2002. A requirement of nuclear factor-kappaB activation in fear-potentiated startle. *J. Biol. Chem.* 277, 46720–46729. doi:10.1074/jbc.M206258200
- Yonelinas, A.P., Kroll, N.E.A., Quamme, J.R., Lazzara, M.M., Sauvé, M.-J., Widaman, K.F., Knight, R.T., 2002. Effects of extensive temporal lobe damage or mild hypoxia on recollection and familiarity. *Nat. Neurosci.* 5, 1236–1241. doi:10.1038/nn961
- Zhang, T., Kohlhaas, M., Backs, J., Mishra, S., Phillips, W., Dybkova, N., Chang, S., Ling, H., Bers, D.M., Maier, L.S., Olson, E.N., Brown, J.H., 2007. CaMKII δ isoforms differentially affect calcium handling but similarly regulate HDAC/MEF2 transcriptional responses. *J. Biol. Chem.* 282, 35078–35087. doi:10.1074/jbc.M707083200
- Zhao, Y., Lu, J., Sun, H., Chen, X., Huang, W., Tao, D., Huang, B., 2005. Histone acetylation regulates both transcription initiation and elongation of hsp22 gene in *Drosophila*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326, 811–816. doi:10.1016/j.bbrc.2004.11.118
- Zhong, H., May, M.J., Jimi, E., Ghosh, S., 2002. The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol. Cell* 9, 625–636.
- Zhong, H., SuYang, H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Ghosh, S., 1997. The transcriptional activity of NF-kappaB is regulated by the IkappaB-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. *Cell* 89, 413–424.
- Zhong, H., Voll, R.E., Ghosh, S., 1998. Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol. Cell* 1, 661–671.
- Zhu, X.O., Brown, M.W., McCabe, B.J., Aggleton, J.P., 1995. Effects of the novelty or familiarity of visual stimuli on the expression of the immediate early gene c-fos in rat brain. *Neuroscience* 69, 821–829.
- Zlatanova, J., Bishop, T.C., Victor, J.-M., Jackson, V., van Holde, K., 2009. The nucleosome family: dynamic and growing. *Struct. Lond. Engl.* 17, 160–171. doi:10.1016/j.str.2008.12.016
- Zovkic, I.B., Paulukaitis, B.S., Day, J.J., Etikala, D.M., Sweatt, J.D., 2014. Histone H2A.Z subunit exchange controls consolidation of recent and remote memory. *Nature* 515, 582–586. doi:10.1038/nature13707

Zovkic, I.B., Sweatt, J.D., 2015. Memory-Associated Dynamic Regulation of the “Stable” Core of the Chromatin Particle. *Neuron* 87, 1–4. doi:10.1016/j.neuron.2015.06.025

VII. APENDICE

VII.1 ANÁLISIS DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS OC Y OA PARA ZIF268

A continuación se muestran los resultados de la búsqueda de complementariedad a ARN (total) o ADN genómico con la herramienta online *Nucleotide BLAST* de NCBI para el oligonucleótido complementario y el oligonucleótido aleatorio, respectivamente. La herramienta online analiza homología (secuencia idéntica) y complementariedad (secuencias complementarias) entre secuencias. Los resultados son plasmados en una tabla generales ordenada en forma descendiente, primero figura el resultado con mayor homología o complementariedad. Por otro lado, se muestra aparte un detalle de los resultados en los que indica si las secuencias son homólogas o complementarias.

VII.1A Oligonucleótido Complementario.

A continuación se muestran los resultados del análisis de complementariedad sobre los transcritos de la especie *Mus Musculus*.

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<u>Mus musculus early growth response 1 (Egr1), mRNA</u>	36.2	36.2	100%	0.15	100%	<u>NM_007913.5</u>
<u>PREDICTED: Mus musculus predicted gene_34153 (Gm34153), transcript variant X2, ncRNA</u>	30.2	30.2	83%	9.5	100%	<u>XR_880749.1</u>
<u>PREDICTED: Mus musculus predicted gene_34153 (Gm34153), transcript variant X1, ncRNA</u>	30.2	30.2	83%	9.5	100%	<u>XR_389654.2</u>
<u>PREDICTED: Mus musculus predicted gene_34153 (Gm34153), transcript variant X2, ncRNA</u>	30.2	30.2	83%	9.5	100%	<u>XR_886682.1</u>
<u>PREDICTED: Mus musculus predicted gene_34153 (Gm34153), transcript variant X1, ncRNA</u>	30.2	30.2	83%	9.5	100%	<u>XR_400735.2</u>
<u>PREDICTED: Mus musculus uncharacterized LOC102640715 (LOC102640715), transcript variant X8, ncRNA</u>	28.2	28.2	77%	37	100%	<u>XR_866404.1</u>
<u>PREDICTED: Mus musculus uncharacterized LOC102640715 (LOC102640715), transcript variant X7, ncRNA</u>	28.2	28.2	77%	37	100%	<u>XR_866403.1</u>
<u>PREDICTED: Mus musculus uncharacterized LOC102640715 (LOC102640715), transcript variant X6, ncRNA</u>	28.2	28.2	77%	37	100%	<u>XR_866402.1</u>
<u>PREDICTED: Mus musculus uncharacterized LOC102640715 (LOC102640715), transcript variant X5, ncRNA</u>	28.2	28.2	77%	37	100%	<u>XR_374626.2</u>
<u>PREDICTED: Mus musculus tousled-like kinase 1 (Ttk1), transcript variant X3, mRNA</u>	28.2	28.2	77%	37	100%	<u>XM_006499190.2</u>
<u>PREDICTED: Mus musculus tousled-like kinase 1 (Ttk1), transcript variant X2, mRNA</u>	28.2	28.2	77%	37	100%	<u>XM_006499189.2</u>
<u>PREDICTED: Mus musculus tousled-like kinase 1 (Ttk1), transcript variant X1, mRNA</u>	28.2	28.2	77%	37	100%	<u>XM_006499188.2</u>
<u>PREDICTED: Mus musculus uncharacterized LOC102640715 (LOC102640715), transcript variant X4, ncRNA</u>	28.2	28.2	77%	37	100%	<u>XR_885854.1</u>
<u>PREDICTED: Mus musculus uncharacterized LOC102640715 (LOC102640715), transcript variant X3, ncRNA</u>	28.2	28.2	77%	37	100%	<u>XR_885853.1</u>
<u>PREDICTED: Mus musculus uncharacterized LOC102640715 (LOC102640715), transcript variant X2, ncRNA</u>	28.2	28.2	77%	37	100%	<u>XR_885852.1</u>
<u>PREDICTED: Mus musculus uncharacterized LOC102640715 (LOC102640715), transcript variant X1, ncRNA</u>	28.2	28.2	77%	37	100%	<u>XR_399858.2</u>
<u>PREDICTED: Mus musculus tousled-like kinase 1 (Ttk1), transcript variant X5, mRNA</u>	28.2	28.2	77%	37	100%	<u>XM_006499193.1</u>
<u>PREDICTED: Mus musculus tousled-like kinase 1 (Ttk1), transcript variant X4, mRNA</u>	28.2	28.2	77%	37	100%	<u>XM_006499191.1</u>
<u>Mus musculus predicted gene_9899 (Gm9899), long non-coding RNA</u>	28.2	28.2	77%	37	100%	<u>NR_040427.1</u>
<u>Mus musculus carboxylesterase 2E (Ces2e), transcript variant 1, mRNA</u>	28.2	28.2	77%	37	100%	<u>NM_172759.3</u>
<u>Mus musculus tousled-like kinase 1 (Ttk1), mRNA</u>	28.2	28.2	77%	37	100%	<u>NM_172664.3</u>

Figura VII.1i. Resultados obtenidos luego del estudio de complementariedad del OC para Zif268.

Los resultados de la figura VII.1i muestran que el OC es 100% complementario (Ident: 100%) al ARNm de Egr-1, que es otra denominación para Zif268, y que se une en su totalidad únicamente a este ARNm (Query Cover: 100%). Luego se observa que tiene una homología del 77% con varios ARN no codificantes (*ncRNA*) y con el ARNm para la quinasa Tlk-1, sin embargo, en este caso las secuencias son homólogas y no complementarias (figura VII.1.ii).

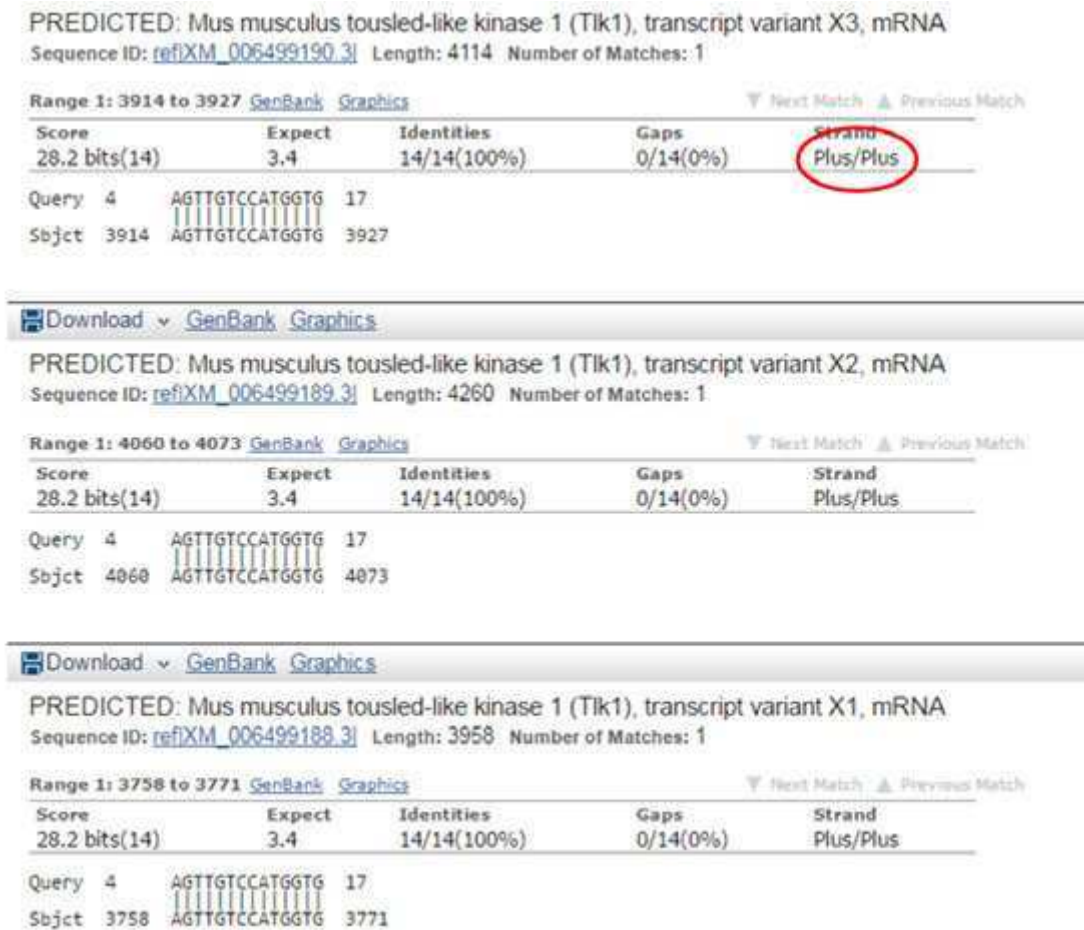


Figura VII.1ii. Resultados obtenidos luego del estudio de complementariedad del OC para Zif268. El círculo en rojo señala la información que indica que las secuencias son homólogas.

Para los casos restantes, el valor E (*E value* en inglés), que es un estimador de la significancia de la homología o complementariedad de bases (cuanto mas pequeño sea el valor, mas significativo), es dos órdenes mayor al valor E para Zif268 por lo que se consideró que la complementariedad del OC a Zif268 es significativamente mayor que para estos casos restantes.

VII.1B Oligonucleótido Aleatorio.

La figura VII.1iii muestra los resultados del análisis de complementariedad para el OA.

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Transcripts						
PREDICTED: Mus musculus membrane protein, palmitoylated 7 (MAGUK p55 subfamily member 7) (Mpp7), transcript variant X7, mRNA	26.3	26.3	72%	148	100%	XM_006526329.2
PREDICTED: Mus musculus membrane protein, palmitoylated 7 (MAGUK p55 subfamily member 7) (Mpp7), transcript variant X5, mRNA	26.3	26.3	72%	148	100%	XM_006526326.2
PREDICTED: Mus musculus membrane protein, palmitoylated 7 (MAGUK p55 subfamily member 7) (Mpp7), transcript variant X4, mRNA	26.3	26.3	72%	148	100%	Show report for XM_011247027.1
PREDICTED: Mus musculus membrane protein, palmitoylated 7 (MAGUK p55 subfamily member 7) (Mpp7), transcript variant X3, mRNA	26.3	26.3	72%	148	100%	XM_011247026.1
PREDICTED: Mus musculus membrane protein, palmitoylated 7 (MAGUK p55 subfamily member 7) (Mpp7), transcript variant X2, mRNA	26.3	26.3	72%	148	100%	XM_011247025.1
PREDICTED: Mus musculus membrane protein, palmitoylated 7 (MAGUK p55 subfamily member 7) (Mpp7), transcript variant X1, mRNA	26.3	26.3	72%	148	100%	XM_006524083.2
PREDICTED: Mus musculus FLYWCH-type zinc finger 1 (Flywch1), transcript variant X4, mRNA	26.3	26.3	72%	148	100%	XM_006524082.2
PREDICTED: Mus musculus FLYWCH-type zinc finger 1 (Flywch1), transcript variant X3, mRNA	26.3	26.3	72%	148	100%	XM_006524081.2
PREDICTED: Mus musculus FLYWCH-type zinc finger 1 (Flywch1), transcript variant X2, mRNA	26.3	26.3	72%	148	100%	XM_006524078.2
PREDICTED: Mus musculus FLYWCH-type zinc finger 1 (Flywch1), transcript variant X1, mRNA	26.3	26.3	72%	148	100%	XM_006526327.1
Mus musculus FLYWCH-type zinc finger 1 (Flywch1), mRNA	26.3	26.3	72%	148	100%	NM_153791.2
Mus musculus membrane protein, palmitoylated 7 (MAGUK p55 subfamily member 7) (Mpp7), transcript variant 2, mRNA	26.3	26.3	72%	148	100%	NM_001161620.1
Mus musculus membrane protein, palmitoylated 7 (MAGUK p55 subfamily member 7) (Mpp7), transcript variant 1, mRNA	26.3	26.3	72%	148	100%	NM_001081287.2
Mus musculus fos-like antigen 1 (Fosl1), mRNA	26.3	26.3	72%	148	100%	NM_010235.2
PREDICTED: Mus musculus WD repeat domain 13 (Wdr13), transcript variant X1, mRNA	24.3	24.3	66%	585	100%	XM_006527703.2
PREDICTED: Mus musculus serum response factor (Srf), transcript variant X2, mRNA	24.3	24.3	66%	585	100%	XM_011246336.1
PREDICTED: Mus musculus serum response factor (Srf), transcript variant X1, mRNA	24.3	24.3	66%	585	100%	XM_006523957.2
PREDICTED: Mus musculus vacuolar protein sorting 13B (yeast) (Vps13b), transcript variant X8, mRNA	24.3	24.3	66%	585	100%	XM_011245377.1
PREDICTED: Mus musculus vacuolar protein sorting 13B (yeast) (Vps13b), transcript variant X7, mRNA	24.3	24.3	66%	585	100%	XM_011245376.1
PREDICTED: Mus musculus vacuolar protein sorting 13B (yeast) (Vps13b), transcript variant X6, misc. RNA	24.3	24.3	66%	585	100%	XR_383832.2

Figura VII.1.iii. Resultados obtenidos luego del estudio de complementariedad del OA para Zif268.

Tal como se observa en la figura, el OA no tiene complementariedad total con ningún transcrito. La mayor homología se observa con el ARNm para la proteína MAGUK, pero aún en este caso, el valor E indica que esta unión tiene poca significancia. De este modo, se consideró que este OA no tiene complementariedad significativa a ningún ARNm y por ende no debería interferir con la expresión de algún gen.

VII.2 ANÁLISIS DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS OC Y OA PARA CAMKII δ .

VII.2A Oligonucleótido Complementario.

A continuación se muestran los resultados del análisis de complementariedad (figura VII.2i)

<u>Mus musculus calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta (Camk2d), transcript variant 7, mRNA</u>	40.1	40.1	100%	0.015	100%	<u>NM_001293666.1</u>
<u>Mus musculus calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta (Camk2d), transcript variant 5, mRNA</u>	40.1	40.1	100%	0.015	100%	<u>NM_001293664.1</u>
<u>Mus musculus calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta (Camk2d), transcript variant 4, mRNA</u>	40.1	40.1	100%	0.015	100%	<u>NM_001293663.1</u>
<u>Mus musculus calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta (Camk2d), transcript variant 3, mRNA</u>	40.1	40.1	100%	0.015	100%	<u>NM_023813.4</u>
<u>Mus musculus calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta (Camk2d), transcript variant 2, mRNA</u>	40.1	40.1	100%	0.015	100%	<u>NM_001025438.2</u>
<u>Mus musculus calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta (Camk2d), transcript variant 1, mRNA</u>	40.1	40.1	100%	0.015	100%	<u>NM_001025439.2</u>
<u>PREDICTED: Mus musculus raf1in family member 2 (Rfn2), transcript variant X5, mRNA</u>	30.2	30.2	75%	14	100%	<u>XM_011238612.1</u>
<u>PREDICTED: Mus musculus raf1in family member 2 (Rfn2), transcript variant X4, mRNA</u>	30.2	30.2	75%	14	100%	<u>XM_011238611.1</u>
<u>PREDICTED: Mus musculus raf1in family member 2 (Rfn2), transcript variant X3, mRNA</u>	30.2	30.2	75%	14	100%	<u>XM_006496309.2</u>
<u>PREDICTED: Mus musculus raf1in family member 2 (Rfn2), transcript variant X2, mRNA</u>	30.2	30.2	75%	14	100%	<u>XM_011238610.1</u>
<u>PREDICTED: Mus musculus raf1in family member 2 (Rfn2), transcript variant X1, mRNA</u>	30.2	30.2	75%	14	100%	<u>XM_006496308.2</u>
<u>Mus musculus raf1in family member 2 (Rfn2), mRNA</u>	30.2	30.2	75%	14	100%	<u>NM_028713.1</u>

Figura VII.2i. Resultados obtenidos luego del estudio de complementariedad del OC para CaMKIIδ.

Los resultados de la figura VII.2i muestran que el OC es 100% complementario (Ident: 100%) al ARNm de CaMKII δ y que se une en su totalidad únicamente a este ARNm (Query Cover: 100%). Luego se observa que tiene una homología del 75% con la proteína Rftn2, sin embargo, en este caso las secuencias son homólogas y no complementarias (plus/plus), además el valor E es 3 órdenes de magnitud mayor. De este modo, se concluye que la unión de este OC a CaMKII δ es significativamente mayor que para otros transcritos.

VII.2B Oligonucleótido Aleatorio.

La figura VII.2ii muestra los resultados del análisis de complementariedad para el OA.

Alignments	Download	GenBank	Graphics	Distance tree of results																
					Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession									
<input type="checkbox"/>					PREDICTED: Mus musculus predicted gene_36581 (Gm36581). ncRNA	26.3	26.3	65%	222	100%	XR_377850.2									
<input type="checkbox"/>					PREDICTED: Mus musculus predicted gene_36581 (Gm36581). ncRNA	26.3	26.3	65%	222	100%	XR_403547.2									
<input type="checkbox"/>					Mus musculus solute carrier family 17 (sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter), member 6 (Slc17a6), mRNA	26.3	26.3	65%	222	100%	NM_080853.3									
<input type="checkbox"/>					PREDICTED: Mus musculus coagulation factor VIII (F8), transcript variant X4, mRNA	24.3	24.3	60%	878	100%	XM_006527792.2									
<input type="checkbox"/>					PREDICTED: Mus musculus coagulation factor VIII (F8), transcript variant X3, mRNA	24.3	24.3	60%	878	100%	XM_006527791.2									
<input type="checkbox"/>					PREDICTED: Mus musculus coagulation factor VIII (F8), transcript variant X2, mRNA	24.3	24.3	60%	878	100%	XM_006527790.2									
<input type="checkbox"/>					PREDICTED: Mus musculus coagulation factor VIII (F8), transcript variant X1, mRNA	24.3	24.3	60%	878	100%	XM_006527789.2									
<input type="checkbox"/>					PREDICTED: Mus musculus RIKEN cDNA 4933408B17, gene (4933408B17Rik), transcript variant X5, mRNA	24.3	24.3	60%	878	100%	XM_011246942.1									
<input type="checkbox"/>					PREDICTED: Mus musculus RIKEN cDNA 4933408B17, gene (4933408B17Rik), transcript variant X4, mRNA	24.3	24.3	60%	878	100%	XM_011246941.1									
<input type="checkbox"/>					PREDICTED: Mus musculus RIKEN cDNA 4933408B17, gene (4933408B17Rik), transcript variant X3, mRNA	24.3	24.3	60%	878	100%	XM_011246940.1									
<input type="checkbox"/>					PREDICTED: Mus musculus RIKEN cDNA 4933408B17, gene (4933408B17Rik), transcript variant X2, mRNA	24.3	24.3	60%	878	100%	XM_011246939.1									
<input type="checkbox"/>					PREDICTED: Mus musculus RIKEN cDNA 4933408B17, gene (4933408B17Rik), transcript variant X1, mRNA	24.3	24.3	60%	878	100%	XM_011246938.1									
<input type="checkbox"/>					PREDICTED: Mus musculus predicted gene_35730 (Gm35730), transcript variant X3, ncRNA	24.3	24.3	60%	878	100%	XR_382033.2									
<input type="checkbox"/>					PREDICTED: Mus musculus predicted gene_35730 (Gm35730), transcript variant X2, ncRNA	24.3	24.3	60%	878	100%	XR_382032.2									
<input type="checkbox"/>					PREDICTED: Mus musculus uncharacterized LOC105243549 (LOC105243549), ncRNA	24.3	24.3	60%	878	100%	XR_880276.1									
<input type="checkbox"/>					PREDICTED: Mus musculus RIKEN cDNA E130111B04, gene (E130111B04Rik), transcript variant X2, ncRNA	24.3	24.3	60%	878	100%	XR_880223.1									
<input type="checkbox"/>					PREDICTED: Mus musculus interleukin 9 receptor (Il9r), transcript variant X6, mRNA	24.3	24.3	60%	878	100%	XM_006514540.2									
<input type="checkbox"/>					PREDICTED: Mus musculus interleukin 9 receptor (Il9r), transcript variant X4, mRNA	24.3	24.3	60%	878	100%	XM_006514538.2									

Figura VII.2ii. Resultados obtenidos luego del estudio de complementariedad del OA para CaMKIIδ.

Considerando los valores máximos de homología entre secuencias (65%) y el elevado valor E (entre tres y cuatro órdenes de magnitud más grande que para los casos en los que hay complementariedad significativa), se consideró que el OA diseñado no es significativamente complementario a otro transcrito por lo que no interfiere con la expresión de otro gen.