



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN PSICOLOGÍA

MECANISMOS CELULARES ASOCIADOS A LA PERSISTENCIA DE LA MEMORIA:
CaMKII Y PLASTICIDAD SINÁPTICA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN PSICOLOGÍA

PRESENTA:

YOLIZTLI YECTIVANI JUÁREZ MUÑOZ

TUTORA:

DRA. MARTHA L. ESCOBAR RODRÍGUEZ
FACULTAD DE PSICOLOGÍA

COMITÉ:

DRA. SARA EUGENIA CRUZ MORALES
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI
INSTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR

DRA. LIVIA SÁNCHEZ CARRASCO
FACULTAD DE PSICOLOGÍA

DRA. JOSEFINA RICARDO GARCELL
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

El presente trabajo fue posible gracias al **Programa de Maestría y Doctorado en Psicología de la UNAM**. Agradezco el asesoramiento para los trámites, así como las facilidades ofrecidas para la realización de este proyecto

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo económico otorgado durante el desarrollo de mi doctorado (No. de beca: 367853).

De la misma forma, agradezco al **Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación en Innovación Tecnológica (PAPIIT IN215816 Y PAPIIT IN215719)** por los recursos concedidos para el desarrollo del presente trabajo.

A mi tutora, la doctora **Martha Lilia Escobar Rodríguez**, por su apoyo incondicional a lo largo de estos años, que no son pocos. Gracias por permitirme formar parte del laboratorio y por aceptar guiarme durante este proceso. Admiro tu pasión por el conocimiento y tu forma de pensar. Muchas gracias, Martha, por tus palabras que me permitieron crecer tanto en el ámbito académico y personal.

A mi comité tutorial por su continua retroalimentación y compromiso con mi formación académica, a la doctora **Sara Eugenia Cruz Morales** por su amabilidad y disposición para realizar aportaciones valiosas para el desarrollo de este trabajo y al doctor **Federico Bermúdez Rattoni** por todas las preguntas y discusiones que enriquecieron tanto este proyecto.

A los miembros de mi jurado de examen, la doctora **Josefina Ricardo Garcell** y a la doctora **Livia Sánchez Carrasco** por el valioso tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y por sus recomendaciones para mejorarlo en todos los aspectos.

A mis compañeros: **Alfredo, Esteban, Salma y Bea** por hacer los días en el laboratorio más llevaderos. Agradezco en especial a la doctora **Laura Elisa Ramos Languren** por todos los conocimientos transmitidos pero sobre todo por la amistad. También agradezco de forma especial al maestro **Alejandro Rivera Olvera** por acompañarme en este proceso de aprendizaje desde que entré al laboratorio, gracias por las risas y por tu amistad.

A mi familia, amigos y a todas las personas que de una u otra manera me han apoyado en este camino, sin ustedes no hubiera sido posible, gracias.

Índice

Resumen.....	i
Abstract.....	ii
Figura resumen.....	iii
Glosario de abreviaturas.....	iv
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	2
2.1. Aprendizaje y memoria.....	2
2.2. Potenciación de largo plazo.....	2
2.2.1. Propiedades de la LTP.....	4
2.2.2. LTP y su relación con los procesos de aprendizaje y memoria.....	5
2.3. Mecanismos moleculares de la LTP	
2.3.1. LTP dependiente de los receptores NMDA.....	7
2.3.2. LTP independiente de los receptores NMDA.....	9
2.4. Mecanismos moleculares de la persistencia de la memoria: CaMKII.....	10
2.5. Formación hipocampal.....	12
2.5.1. Fibras Musgosas.....	13
2.6. Corteza Insular.....	14
2.6.1. Condicionamiento de aversión a los sabores.....	15
2.6.2. Integración de la información gustativa y visceral implicada en el CAS.....	16
2.7. CaMKII en la LTP paleo y neocortical.....	17
3. Planteamiento del problema.....	19
4. Objetivos.....	19
5. Procedimiento experimental.....	20
5.1. Sujetos.....	20
5.2. CaMKII en el mantenimiento de la plasticidad sináptica paleocortical	
5.2.1. Registros electrofisiológicos.....	20
5.2.2. Técnica histoquímica de Timm.....	21
5.2.3. Análisis histológico.....	22
5.2.4. Western Blot.....	23
5.3. CaMKII en el mantenimiento de la plasticidad sináptica neocortical	
5.3.1. Registros electrofisiológicos.....	24
5.3.2. Western Blot.....	25
5.3.2. Implantación de cánulas en la CI.....	25
5.3.4. Microinfusiones.....	25
5.3.5. Condicionamiento de aversión al sabor.....	26
5.3.6. Histoquímica de Nissl.....	27

5.4. Diseño experimental	
5.4.1. CaMKII en el mantenimiento de la plasticidad sináptica de la vía FM-CA3.....	27
5.4.2. CaMKII en el mantenimiento de la plasticidad sináptica de la vía Bla-CI.....	28
5.4.2.1. Fase A.....	28
5.4.2.2. Fase B.....	29
6. Resultados.....	31
6.1. CaMKII en el mantenimiento de la plasticidad sináptica de la vía FM-CA3	
6.1.1. La inhibición de la fosforilación de CaMKII revierte la LTP en la vía FM-CA3 en ratas adultas <i>in vivo</i>	31
6.2.1. La inhibición de CaMKII previene la reorganización morfológica que acompaña a la potenciación inducida por HFS en las FM.....	33
6.2. CaMKII en el mantenimiento de la plasticidad sináptica de la vía Bla-CI	
6.2.1. Fase A: La inhibición de la fosforilación de CaMKII revierte la LTP en la vía Bla-CI en ratas adultas <i>in vivo</i>	35
6.2.1. Fase B: La inhibición de CaMKII impide el mantenimiento de la MLP del CAS.....	37
7. Discusión.....	39
7.1. CaMKII es necesaria para la plasticidad sináptica funcional y estructural en la vía FM-CA3.....	39
7.2. CaMKII es necesaria para el mantenimiento de la plasticidad sináptica en la vía Bla-CI y para la persistencia de la memoria del CAS.....	41
8. Conclusiones.....	45
9. Referencias.....	46
10. Anexo I.....	59
11. Anexo II.....	67

Resumen

Una de las preguntas centrales en el campo de la neurociencia cognitiva se refiere a cómo se mantiene la memoria por periodos prolongados. El fenómeno de plasticidad sináptica conocido como potenciación de largo plazo (LTP por las siglas en inglés de long-term potentiation) ha contribuido de manera sustancial a la comprensión de los mecanismos celulares asociados a la memoria. Recientemente se ha propuesto a la proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina tipo II (CaMKII) como una molécula central en el mantenimiento de la LTP y en consecuencia de la memoria, aunque el conocimiento al respecto es aún incipiente. Por ello, en el presente trabajo se evaluó el papel de CaMKII en el mantenimiento de la LTP, así como de la memoria en dos áreas relevantes para el procesamiento de información: el hipocampo y la neocorteza.

En el caso del hipocampo la vía de las fibras musgosas hacia el área CA3 (FM-CA3) permite el análisis de la relación entre la expresión de la LTP y los cambios morfológicos asociados al mantenimiento de la memoria. Con este propósito, se efectuó la administración aguda del inhibidor no competitivo de CaMKII (myr-CaMKIINTide) en el área CA3 del hipocampo de ratas adultas durante la fase de mantenimiento de la LTP de la vía FM-CA3 *in vivo*. Siete días después de la inducción de la LTP se evaluó la reorganización morfológica en el área CA3 del hipocampo. Los resultados muestran que la inhibición de CaMKII bloquea el mantenimiento de la LTP de las fibras musgosas e impide la reorganización estructural en el área CA3.

En el caso de la neocorteza, se ha demostrado que la inducción de LTP en la vía que va del núcleo basolateral amigdalino (Bla) hacia la corteza insular (CI) modula la retención de la memoria del condicionamiento de aversión a los sabores (CAS), en el cual un estímulo gustativo novedoso es asociado con un malestar gástrico. Con el propósito de analizar la participación de CaMKII en este proceso, se llevó a cabo la administración intracortical del inhibidor selectivo myr-CaMKII durante la fase de mantenimiento de la LTP en la vía Bla-CI de ratas adultas *in vivo*, así como veinticuatro horas después de la adquisición del CAS. Los resultados muestran que la inhibición de CaMKII en la CI veinticuatro horas después de la adquisición de esta tarea, deteriora la persistencia de la memoria del CAS y revierte la LTP de la vía Bla-CI de manera persistente.

En conjunto, estos hallazgos apoyan la idea de que CaMKII es un sustrato molecular clave en el mantenimiento a largo plazo de la plasticidad sináptica que subyace a la persistencia de la memoria.

Abstract

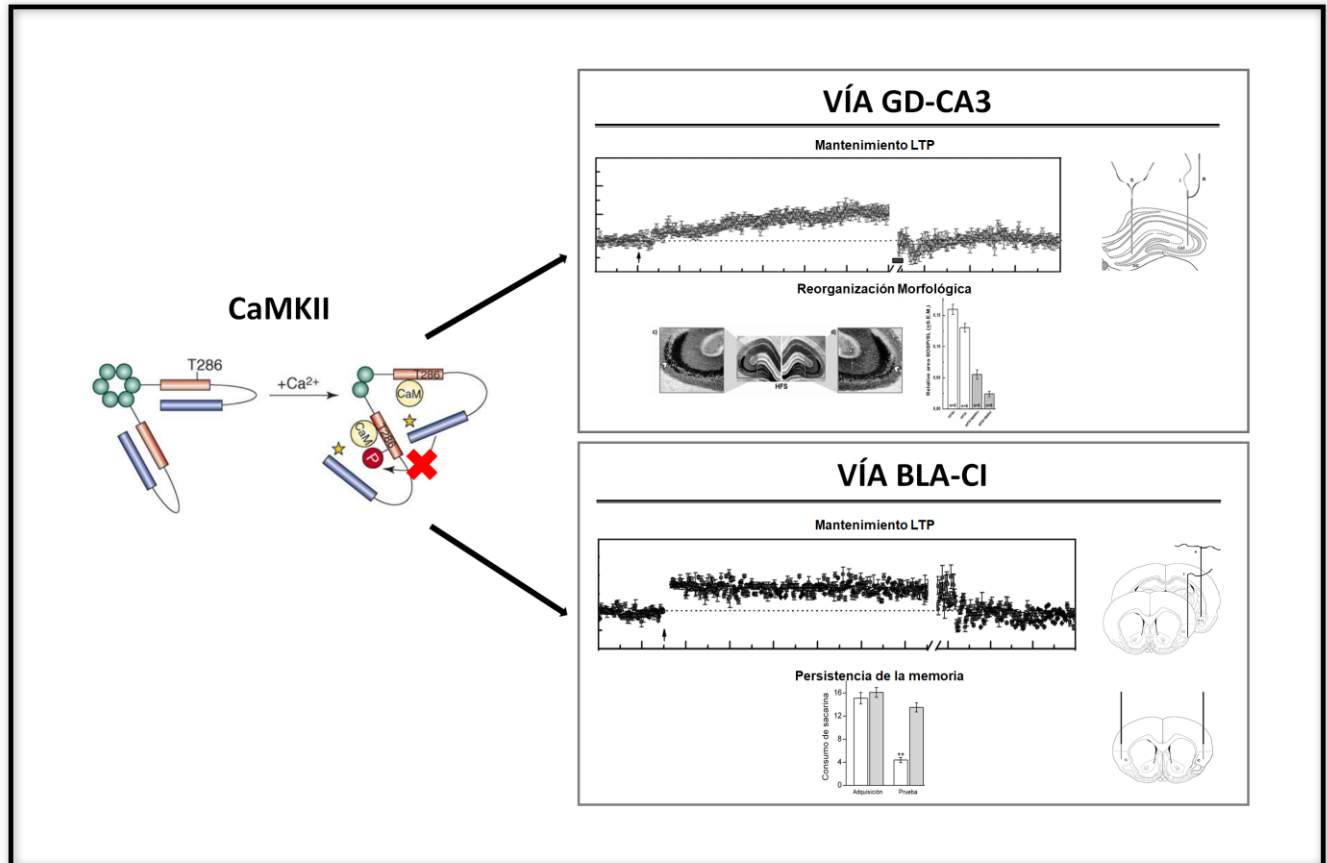
A central question in the field of cognitive neuroscience refers to how memory is maintained for prolonged periods. The phenomenon of synaptic plasticity known as long-term potentiation (LTP) has contributed substantially to the understanding of the cellular mechanisms associated with memory. Recently, calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II (CaMKII) has been proposed as a central molecule in the maintenance of LTP and consequently of memory, although knowledge about this is still incipient. Therefore, in the present work we evaluated the role of CaMKII in the maintenance of LTP, as well as memory in two relevant areas for information processing: the hippocampus and the neocortex.

In the case of the hippocampus, the pathway connecting mossy fibers to the CA3 area (MF-CA3) allows the analysis of the relationship between the expression of LTP and the morphological changes associated with memory maintenance. For this purpose, acute administration of the non-competitive CaMKII inhibitor (myr-CaMKIINtide) was carried out in the CA3 area of the hippocampus of adult rats during the maintenance phase of the MF-CA3 LTP *in vivo*. Seven days after the induction of LTP, the morphological reorganization in the CA3 area of the hippocampus was evaluated. The results show that the inhibition of CaMKII blocks the maintenance of the LTP of the mossy fibers and prevents the structural reorganization in the CA3 area.

In the case of the neocortex, our previous studies have demonstrated that induction of LTP in the basolateral amygdaloid nucleus-insular cortex (Bla-IC) pathway before CTA training increased the retention of this task. Although it is known that IC-LTP induction and CTA consolidation share similar molecular mechanisms, little is known about the molecular actors that underlie their maintenance. The purpose of the present study was to evaluate the role of CaMKII in the maintenance of *in vivo* Bla-IC LTP as well as in the persistence of CTA long-term memory (LTM). Our results show that acute microinfusion of myr-CaMKIINtide, in the IC of adult rats during the late-phase of *in vivo* Bla-IC LTP blocked its maintenance. Moreover, the intracortical inhibition of CaMKII twenty-four hours after CTA acquisition impairs CTA-LTM persistence.

Taken together, these findings support the idea that CaMKII is a key molecular substrate in the long-term maintenance of the synaptic plasticity that underlies memory persistence.

Figura resumen



Glosario de abreviaturas

Abreviatura	Significado
ACSF	Líquido ceforraquídeo artificial
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
AMPC	Adenosín monofosfato cíclico
AP	Antero-posterior
ARN	Ácido ribonucléico
Bla	Núcleo basolateral de la amígdala
CaM	Calcio-calmodulina
CaMKII	Proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina tipo II
CAMKIV	Proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina tipo IV
CAS	Condicionamiento de aversión al sabor
CEA	Núcleo central de la amígdala
CI	Corteza insular
CRE	Elemento responsivo a AMPc
CREB	Proteína de unión al elemento responsivo a AMPc
DCG-IV	(2 <i>S</i> ,2' <i>R</i> ,3' <i>R</i>)-2-(2',3'-Dicarboxiciclopropil) glicina
GD	Giro dentado
dls	Subnúcleo dorsolateral del PBN
DV	Dorso-ventral
EC	Estímulo condicionado
EI	Estímulo incondicionado
els	Subnúcleo exterior lateral del PBN
ERK	Proteína cinasa regulada por una señal extracelular
HFS	Estimulación de alta frecuencia
IIP-MF	Haz infrapiramidal de las fibras musgosas
LTP	Potenciación de largo plazo

MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
MCP	Memoria de corto plazo
mGluRII	Receptores metabotrópicos de glutamato del grupo II
ML	Medio-lateral
MLP	Memoria de largo plazo
NBM	Núcleo basal magnocelular
NMDA	N-metil-D-aspartato
NR2B	Subunidad 2 del receptor NMDA
NTS	Núcleo del tracto solitario
PBN	Núcleo parabraquial del puente
PKA	Proteína cinasa dependiente deAMPc
PKC	Proteína cinasa C
PLC γ	Fosfolipasa C γ
PPSEs	Potenciales postsinápticos excitatorios
PRPs	Productos relacionados con la plasticidad
SL	Estrato lúcido
SO	Estrato oriens
SP	Estrato piramidal
SP-MF	Haz suprapiramidal de las fibras musgosas
VPL	Núcleo ventroposterolateral del tálamo
VPM	Núcleo ventral posteromedial del tálamo

1. Introducción

Los organismos vivos están sujetos a cambios constantes en el ambiente, por ello es necesario que tengan la habilidad de establecer relaciones entre los elementos en su entorno para asegurar su supervivencia. El aprendizaje, es decir, el mecanismo a través del cual se adquiere información acerca del mundo, y la memoria, el mecanismo por el cual la información adquirida es almacenada (Bear et al., 2015), son los procesos cognitivos que subyacen a dicha función. El comportamiento exhibido por un animal es resultado de la actividad del sistema nervioso central, en tanto que la habilidad del sistema nervioso central para adquirir y almacenar información se sustenta en la capacidad de las neuronas de modificar su comunicación sináptica, ya sea mediante el cambio en la naturaleza, fuerza o número de contactos sinápticos (Sweatt, 2016). Esta capacidad de experimentar modificaciones en las conexiones sinápticas se conoce como plasticidad sináptica (Malenka y Bear, 2004; Nicoll, 2017).

El fenómeno de plasticidad sináptica conocido como potenciación de largo plazo o LTP (por las siglas en inglés de long-term potentiation) ha sido central para entender las bases celulares y moleculares que subyacen al almacenamiento de información (Malenka y Bear, 2004). Durante la LTP se observa un incremento persistente en la eficiencia de la comunicación sináptica en respuesta a un cambio en la actividad neuronal, este fenómeno se puede inducir de manera experimental mediante la administración de breves estímulos eléctricos de alta frecuencia. De manera interesante, este fenómeno puede traducirse en modificaciones morfológicas en las neuronas; además de que guarda una relación cercana con cambios en el comportamiento (Lynch, 2007).

El estudio de la LTP ha permitido definir a un conjunto de actores moleculares que subyacen al establecimiento de la memoria. Sin embargo, poco se conoce acerca de aquellos mecanismos moleculares que tienen injerencia en el mantenimiento de la memoria por periodos prolongados. A este respecto se ha propuesto la participación de algunas proteínas entre las que destaca la proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina tipo II (CaMKII). Se ha propuesto que debido a su capacidad de permanecer activa en un estado autofosforilado aún en ausencia del estímulo inicial (Lisman et al., 2012), CaMKII podría jugar un papel central en el mantenimiento de la LTP y por lo tanto de la memoria de largo plazo.

2. Antecedentes

2.1. Aprendizaje y memoria

El aprendizaje y la memoria son procesos cognitivos vitales para los organismos. El aprendizaje ha sido definido como el mecanismo a través del cual se adquiere información, en tanto que la memoria es el mecanismo por el cual la información adquirida es almacenada (Bear et al., 2015).

La memoria puede dividirse en función del tiempo que la información permanece disponible para el organismo, así, la memoria se divide en memoria de corto y de largo plazo. La memoria de corto plazo (MCP) como su nombre lo indica es una memoria de corta duración, de entre segundos a horas, mientras que la memoria de largo plazo (MLP) es una memoria más duradera y que incluso puede permanecer durante toda la vida (Gale et al., 2004) (Figura 1).

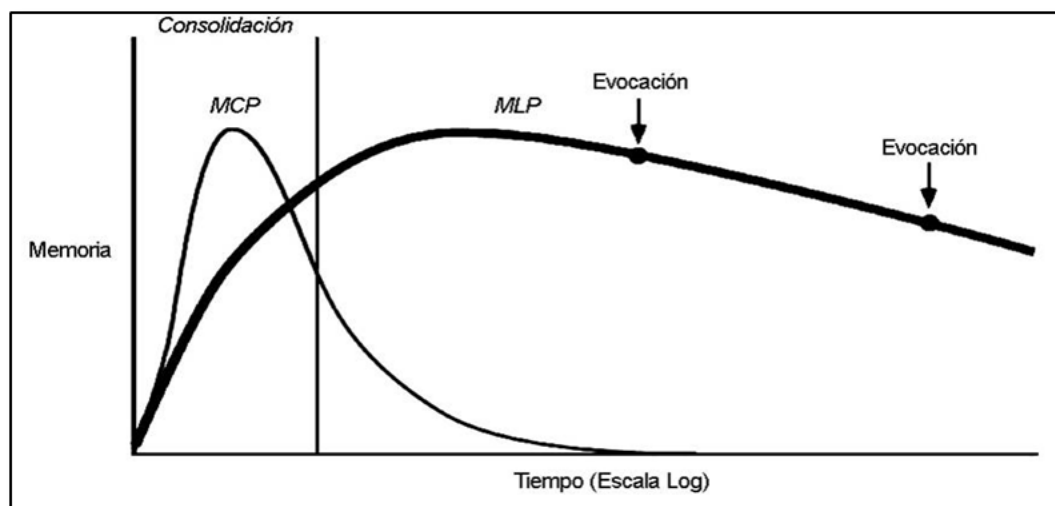


Figura 1. Clasificación temporal de la memoria. MCP: Memoria de corto plazo, MLP: Memoria de largo plazo (Modificado de Dudai, 2004).

2.2. Potenciación de largo plazo

Las sinapsis en el sistema nervioso poseen la capacidad de modificar tanto la fortaleza, como la estructura de las conexiones que establecen en respuesta a diferentes estímulos. Así, la serie de cambios en las propiedades funcionales de las sinapsis como producto de su actividad se ha denominado plasticidad sináptica (Malenka y Bear, 2004; Nicoll, 2017; Sweatt, 2016).

Santiago Ramón y Cajal propuso que los cambios en la fuerza de las conexiones sinápticas era el mecanismo que subyace al aprendizaje y la memoria, idea retomada por Donald Hebb quién postuló que cuando “el axón de una célula A está suficientemente cerca para excitar a una célula B y repetida o persistentemente toma parte de su activación, algún cambio metabólico o estructural tiene lugar en alguna de las dos células de modo que la eficacia de A para activar B incrementa” (Hebb, 1949).

El fenómeno de potenciación de largo plazo de la transmisión sináptica excitatoria no fue descrito experimentalmente sino hasta 1973 por Bliss y Lømo, quienes reportaron que la administración de trenes breves de alta frecuencia en la vía que va del patrón perforante al giro dentado (GD) en el hipocampo de conejos anestesiados aumentaba la fuerza de las conexiones sinápticas, medida a través de los cambios en la pendiente de los potenciales postsinápticos excitatorios (PPSEs). Actualmente la LTP es definida como el incremento prolongado de la eficiencia sináptica debido a la estimulación de las fibras aferentes a un área determinada del sistema nervioso (Figura 2).

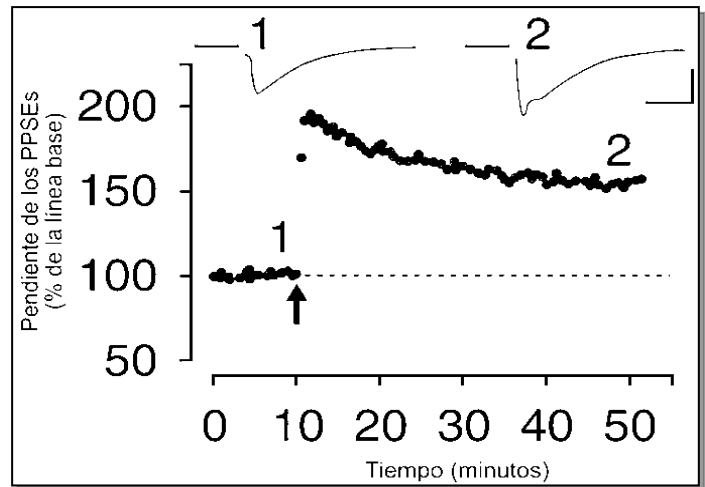


Figura 2. Ejemplo de potenciación de largo plazo. La gráfica muestra la pendiente de los potenciales postsinápticos excitatorios (PPSEs) del área CA1 hipocampal antes (1) y después (2) de la aplicación de estimulación de alta frecuencia (flecha: 100 Hz de estimulación por un segundo) en el área CA3 del hipocampo, se observa un incremento en la pendiente de los PPSE. En la parte superior se muestran los trazos representativos (Modificado de Citri y Malenka, 2008).

Aunque la LTP fue reportada inicialmente en el hipocampo, actualmente se conoce que es posible inducir LTP en distintas áreas del sistema nervioso (Abraham, 2008; Citri y Malenka., 2008). En el hipocampo además del patrón perforante (Bliss et al., 1973) el fenómeno se ha reportado en las colaterales de Schaffer (Abraham et al., 1997; Wang et al., 1996) y en las fibras musgosas (Derrick et al., 1991; Escobar et al., 1997). Entre las áreas no hipocampales donde se ha reportado la expresión de LTP se encuentra la vía que va del tálamo auditivo a la amígdala (Clugnet et al., 1990), dentro del cerebelo en la vía de comunicación que se establece entre las fibras paralelas y las neuronas de Purkinje (Losi et

al., 2002); en la vía que va de la corteza al estriado (Calabresi et al., 2000) y en otras regiones de la neocorteza (Artola et al, 1990; Bear et al., 1993; Escobar et al, 1998a; Tsumoto, 1992).

2.2.1. Propiedades de la LTP

Se pueden reconocer tres propiedades fundamentales de la LTP: la cooperatividad, la especificidad y la asociatividad (Figura 3). La cooperatividad se manifiesta por un fuerte requerimiento de la actividad simultánea de las fibras presinápticas, permitiendo alcanzar la estimulación necesaria para inducir la LTP. La especificidad se refiere a que sólo aquellas fibras que fueron activadas por la estimulación generadora de LTP presentarán modificaciones en la respuesta sináptica. Finalmente, la asociatividad se refiere al hecho de que la LTP puede ser inducida en las sinapsis que son activadas por estímulos subumbral, cuando su activación coincide temporalmente con un estímulo capaz de inducir LTP en otro conjunto de sinapsis (Malenka, 2003). Además de las características anteriormente mencionadas otra propiedad de la LTP es su permanencia, se ha observado que este fenómeno se puede mantener por horas, días, meses y en algunos casos, por años (Abraham et al., 2002; Taylor et al., 2016). En conjunto estas características hacen que la LTP sea considerada como un fenómeno que engloba parte de los mecanismos celulares que subyacen al almacenamiento de información.

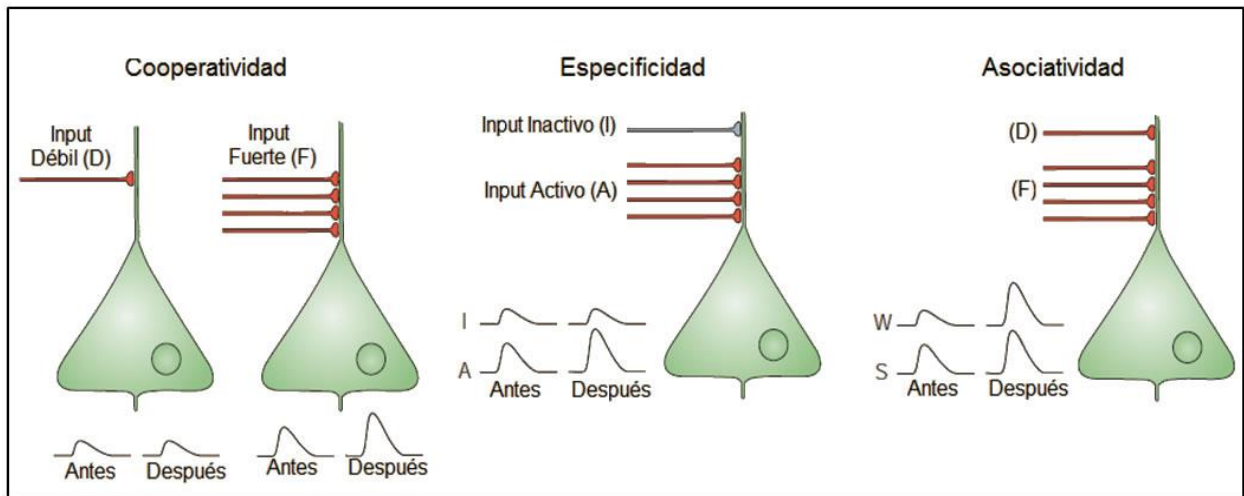


Figura 3. Características generales de la LTP. (Modificado de Malenka, 2003).

Funcionalmente, los procesos que subyacen a la LTP se pueden clasificar en tres categorías: procesos de inducción, mantenimiento y expresión. La inducción se refiere a los eventos que ocurren cerca del momento de la estimulación y que desencadenan los procesos de expresión y mantenimiento posteriores. A través del proceso de expresión se propicia la potenciación, observada como un aumento en los PPSEs. Finalmente, si la estimulación ha sido suficiente, entonces se da lugar al proceso de mantenimiento que como se propone, subyace al almacenamiento de la información (Lisman, 2017).

Por último, de manera similar a las fases de la memoria, se reconocen dos fases de la LTP en términos de su temporalidad. La potenciación evidente durante los primeros minutos después de la inducción se conoce como LTP temprana. Si las condiciones de inducción son suficientemente fuertes, la LTP temprana es seguida por procesos neuroquímicos y estructurales que producen un fortalecimiento estable de la sinapsis conocido como LTP tardía (Baltaci et al., 2019; Huang et al., 1994; Mayadevi et al., 2012).

2.2.2. LTP y su relación con los procesos de aprendizaje y memoria

Existen numerosas evidencias experimentales que muestran la estrecha relación existente entre los procesos de aprendizaje y memoria y el fenómeno de la LTP. Algunos de estos ejemplos se derivan de los estudios realizados por dos grupos independientes en la región de la amígdala. Rogan y cols. (1997) demostraron en un modelo *in vivo* que el condicionamiento al miedo produce incrementos en la pendiente y en la amplitud de los PPSEs en la amígdala lateral de ratas adultas (Rogan et al., 1997). De manera similar, McKernan y Shinnick-Gallagher (1997), demostraron que 24 hrs después del entrenamiento en una tarea de condicionamiento al miedo, se producía una facilitación presináptica en la amígdala lateral en preparaciones *in vitro* (McKernan y Shinnick-Gallagher, 1997). Por otro lado, en la corteza motora primaria de ratas adultas se ha observado que el aprendizaje de habilidades motoras produce un aumento de la amplitud de los PPSEs en la corteza motora del hemisferio entrenado, siendo este cambio significativo con respecto a la corteza motora primaria del hemisferio contralateral (Riout-Pedotti et al., 1998). En concordancia con lo anterior, un estudio en el hipocampo demostró el incremento de la eficiencia sináptica en el área CA1 de ratas adultas *in vivo* después del entrenamiento en una tarea dependiente de la actividad del hipocampo (Whitlock et al., 2006).

Además, se ha demostrado que los mecanismos moleculares que subyacen al fenómeno de la LTP son análogos a los derivados de la actividad inherente al almacenamiento de información tras el entrenamiento en diversas tareas conductuales (Giese y Mizuno, 2013; Jacobs et al., 2014; Katche et al., 2013), sustentando a la LTP como el sustrato celular de la memoria (Figura 4). Entre los eventos moleculares reportados se propone la activación de receptores a glutamato (Cui et al. 2004; Riedel et al., 2000); la activación de proteínas cinasas (Pan et al., 2012; Sutton et al., 2001; Wiczoreck et al., 2010); la expresión de genes (Katche et al., 2010, Wang et al., 2018); la síntesis de proteínas (Bekinschtein et al., 2010) y la reorganización sináptica (Nakahata y Yasuda, 2018; Ramos-Languren et al., 2013), entre otros.

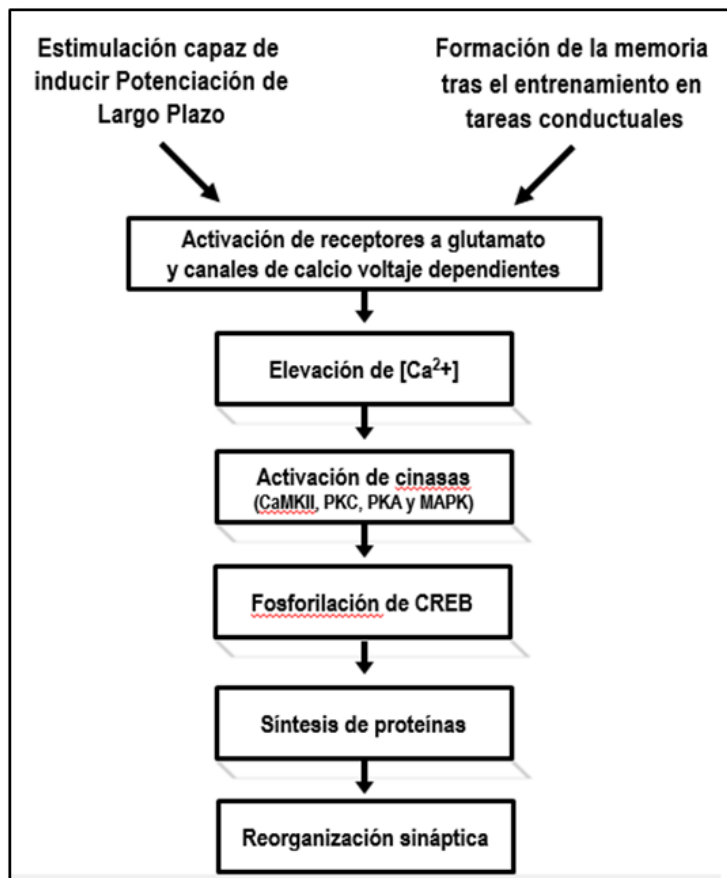


Figura 4. Diagrama que muestra la confluencia de los mecanismos moleculares asociados a la LTP y a la formación de la memoria tras el entrenamiento en distintas tareas conductuales.

Por su parte las investigaciones en torno a los mecanismos celulares que subyacen al proceso de reconsolidación de la memoria, es decir el proceso mediante el cual las memorias reactivadas atraviesan nuevamente un proceso de consolidación activa (Alberini, 2013), muestran que tanto la consolidación como la reconsolidación requieren de algunos procesos en común; tal es el caso de la síntesis de proteínas, la activación de cinasas y la expresión de genes (ambas requieren del factor de transcripción CREB) (Merlo et al., 2015; Tronson y Taylor, 2007). Sin embargo, algunas investigaciones sugieren que mientras que el proceso de consolidación de la memoria requiere de la neurotrofina denominada BDNF (por las siglas en inglés de brain-derived neurotrophic factor), la reconsolidación no muestra un requerimiento similar. Por su parte, el gen de expresión temprana Zif268 es requerido durante los procesos de reconsolidación pero no durante la consolidación sináptica. No obstante, esta dicotomía podría no prevalecer para todos los tipos de memoria (Lee et al., 2004; Bozon et al., 2003). Asimismo, recientes investigaciones demuestran que el aumento en la excitabilidad de las células del engrama no solo es necesario durante la consolidación sináptica, sino que dicho efecto también está presente de manera transitoria durante la reactivación de la memoria. Se ha propuesto que este incremento transitorio de la excitabilidad del engrama se manifiesta en la capacidad de los organismos para recordar de manera precisa (Pignatielli et al., 2019). Es importante destacar que, durante los procesos de actualización de la memoria, los cambios en la capacidad de las sinapsis de experimentar plasticidad debido a la experiencia previa juegan un papel esencial (Abraham y Bear, 1996; Abraham, 2008).

2.3. Mecanismos moleculares de la LTP

2.3.1. LTP dependiente de los receptores NMDA

El principal neurotransmisor involucrado en la inducción de la LTP es el glutamato. Existen dos tipos de receptores ionotrópicos a glutamato que tienen un papel central en la inducción de la LTP: los receptores α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA). Los receptores AMPA (AMPAr) pueden ser activados por la unión del ligando aun cuando el potencial de membrana se encuentra en reposo, y permiten el flujo de iones Na^{2+} al interior de la neurona postsináptica. Los receptores NMDA (NMDAr), una vez activados permiten el paso de Ca^{2+} al interior de la neurona postsináptica, sin embargo, no permiten el paso de iones cuando el potencial de membrana se encuentra en reposo, ya que el poro que conforma al canal está bloqueado por el ion

Mg⁺. Así, es necesario que se activen los AMPAR para que la entrada de Na²⁺ a través de éstos produzca la despolarización de la neurona postsináptica, permitiendo que el ion Mg⁺ sea liberado del poro y se permita la entrada de Ca²⁺ a través de los NMDAR hacia la neurona postsináptica (Ho et al., 2011).

La entrada de Ca²⁺ en la neurona postsináptica hace posible la inducción de la LTP. El Ca²⁺ se une a la proteína calmodulina y este complejo calcio/calmodulina activa a distintas proteínas cinasas, entre las que destaca la cinasa regulada por señal extracelular (ERK), un miembro de la familia de las cinasas activadas por mitógeno (MAPK). Se ha descrito que una vez activada, ERK transloca rápidamente al núcleo de las neuronas, donde fosforila a distintos factores que regulan la transcripción, lo cual favorece la transcripción de ARN mensajero que puede ser transportado hacia la densidad postsináptica donde se traduce en las proteínas que son requeridas para la formación de la memoria (Figura 5).

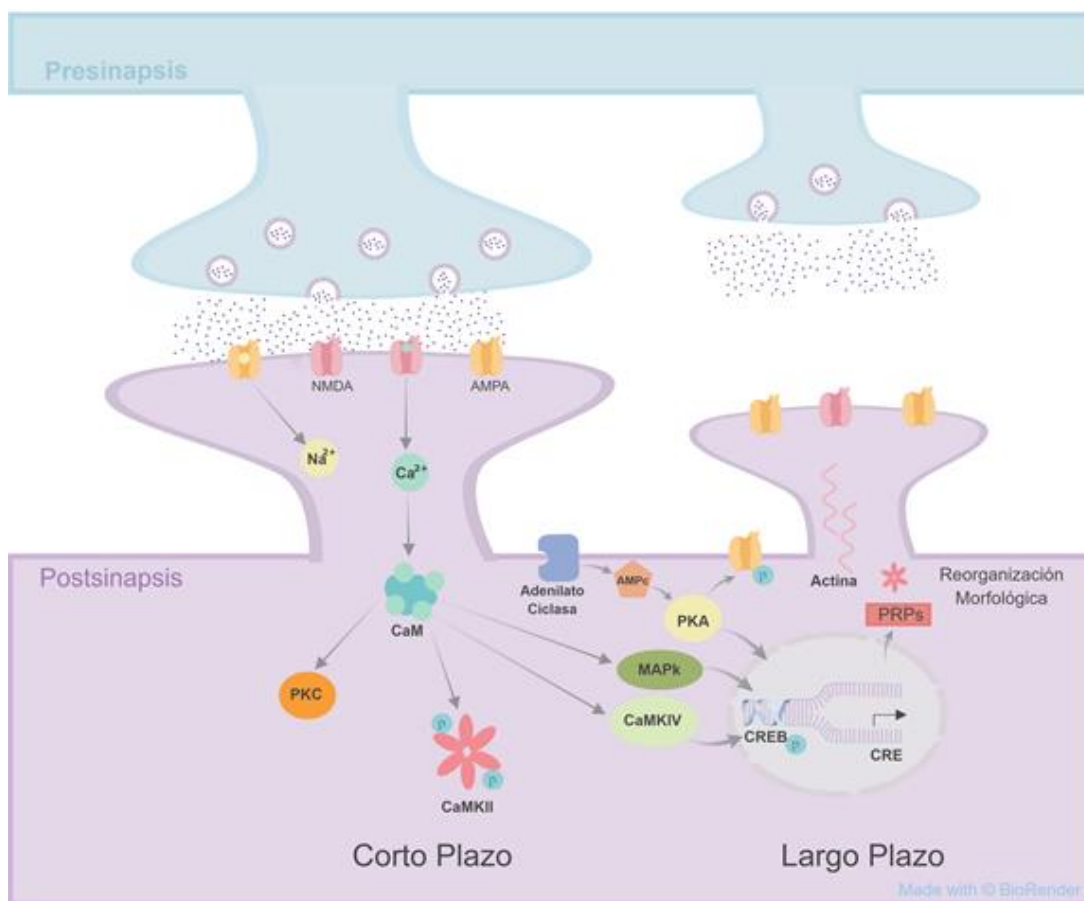


Figura 5. Mecanismos moleculares de la potenciación de largo plazo dependiente de receptores NMDA. Esquema que muestra parte de los mecanismos moleculares involucrados en el corto y el largo plazo de la LTP (modificado de Huang et al., 1996).

2.3.2. LTP independiente de los receptores NMDA

La vía prototípica para estudiar la LTP independiente de la activación de los NMDAR es la vía de las fibras musgosas (FM) que va del giro dentado al área CA3 del hipocampo. Se ha demostrado que la LTP en esta vía es independiente de la activación de los NMDAR pues la administración de fármacos antagonistas de este receptor no impide la inducción de la LTP (Harris y Cotman, 1986). La expresión de esta forma de LTP depende entonces de mecanismos presinápticos y de la participación de la proteína cinasa A (PKA) (López-García et al., 1996). Asimismo, se ha observado que la administración de (2S,2'R,3'R)-2-(2',3'-Dicarboxi Ciclopropil) glicina (DCG-IV), un agonista de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo II (mGluRII) reduce los potenciales de campo, bloquea la transmisión sináptica y la señalización de Ca^{2+} presináptica (Nicoll y Schmitz, 2005). Se ha reportado que el efecto que produce la aplicación de DCG-IV se debe a que la activación de los receptores mGluRII reduce la liberación presináptica de zinc, así como la transmisión sináptica (Figura 6) (Matias et al., 2014).

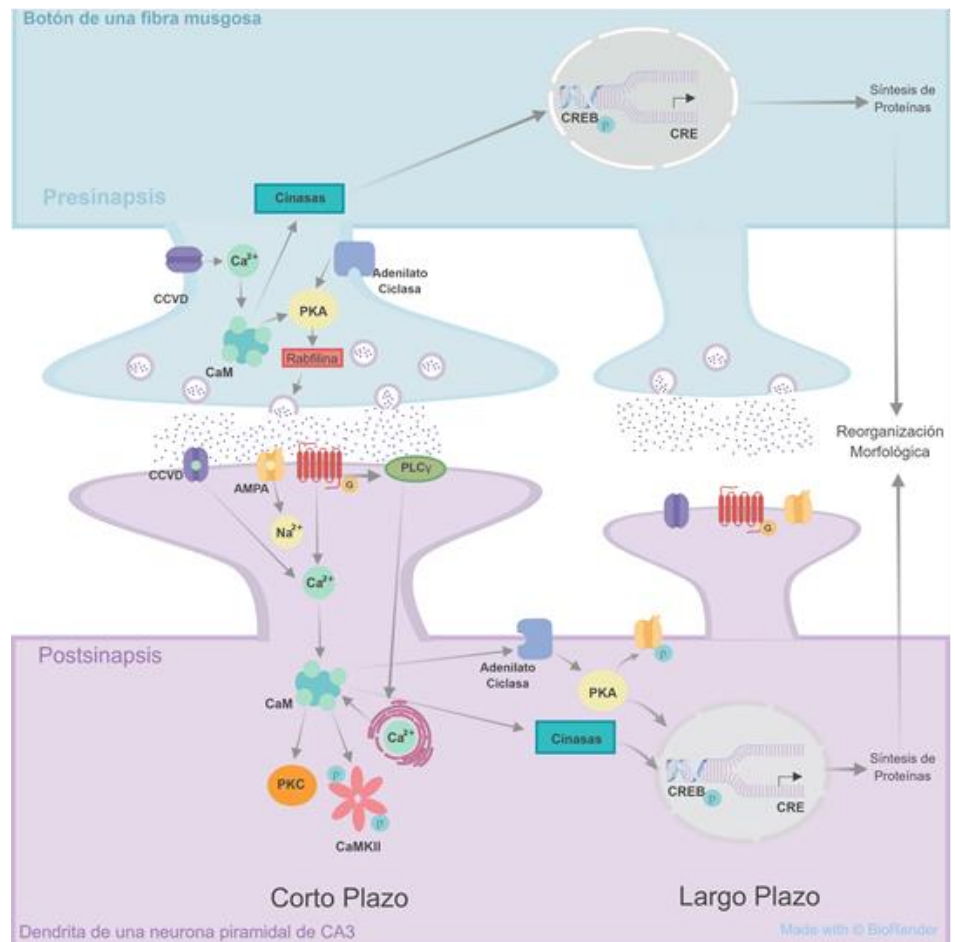


Figura 6. Mecanismos moleculares de la potenciación de largo plazo independiente de receptores NMDA. Esquema que muestra parte de los mecanismos moleculares involucrados en el corto y el largo plazo de la LTP de las fibras musgosas.

2.4. Mecanismos moleculares de la persistencia de la memoria: CaMKII

Las investigaciones en torno al estudio de las bases moleculares del aprendizaje y la memoria han identificado a proteínas esenciales que intervienen en los procesos de adquisición y consolidación de la información (Lamprecht y LeDoux, 2004). Sin embargo, se sabe muy poco acerca de los procesos involucrados en la persistencia de la MLP. Se ha propuesto que la persistencia de la MLP es un proceso que requiere la activación de varias moléculas y síntesis de nuevas proteínas en ventanas temporales posteriores (12 y 24 horas) a la adquisición (Katche et al., 2013; Parfitt et al., 2012; Pereira et al., 2018). A este respecto, en los últimos años ha destacado de manera significativa la participación de distintas proteínas, entre las cuales destaca la proteína calcio calmodulina-cinasa tipo II (CaMKII) (Coultrap y Bayer, 2012; Lisman et al., 2012).

Se conocen cuatro isoformas de CaMKII (α , β , γ y δ) codificadas por genes separados, siendo las isoformas α y β las más abundantes en el cerebro; con una proporción $\alpha:\beta$ de 3 a 1. Se calcula que ambas isoformas de CaMKII constituyen alrededor del 1% de la proteína total del cerebro. Las holoenzimas de CaMKII están formadas por 12 subunidades asociadas a través de sus dominios de asociación C-terminal. Las subunidades se acoplan en dos anillos hexaméricos superpuestos dando a la proteína su forma característica de roseta. Esta disposición espacial permite que exista una interacción entre subunidades contiguas. Cada subunidad de CaMKII se compone de un dominio catalítico, un dominio autoinhibitorio y un dominio de asociación (Figura 7). Dentro del dominio autoinhibitorio existe una región que imita a los sustratos protéicos, esta región sirve como un pseudosustrato y se une a la región catalítica en el sitio de unión a sustrato (sitio S). El dominio autoinhibitorio entonces inhibe la actividad enzimática en condiciones basales (Irvine et al., 2006; Lisman et al., 2002; Lisman et al., 2012).

La formación de la memoria depende en gran parte de la activación de receptores ionotrópicos glutamatérgicos y la posterior entrada de calcio a la neurona postsináptica, además de la liberación de Ca^{2+} de las pozas intracelulares. Una vez que el Ca^{2+} entra en la célula, éste se une con la calmodulina. El complejo calcio/calmodulina promueve la activación de las subunidades de CaMKII mediante el desplazamiento del dominio autoinhibitorio. Además de la activación de la subunidad, la unión del complejo calcio/calmodulina propicia la exposición del residuo treonina 286 (T286) del dominio autoinhibitorio (para las subunidades α CaMKII o treonina 287 (T287) para las subunidades β CaMKII).

Este sitio puede ser fosforilado debido a la interacción con el dominio catalítico de la subunidad contigua, haciendo que el segmento autoinhibitorio no pueda volver asociarse a la subunidad catalítica, lo cual deja a CaMKII en un estado activo aún en ausencia de Ca^{2+} . En este estado se dice que CaMKII es autónoma, debido a que su actividad es independiente de la presencia de Ca^{2+} en la célula (Lisman, 2002). La fosforilación intersubunidad es uno de los mecanismos que hacen que CaMKII sea un candidato molecular de la persistencia de la memoria.

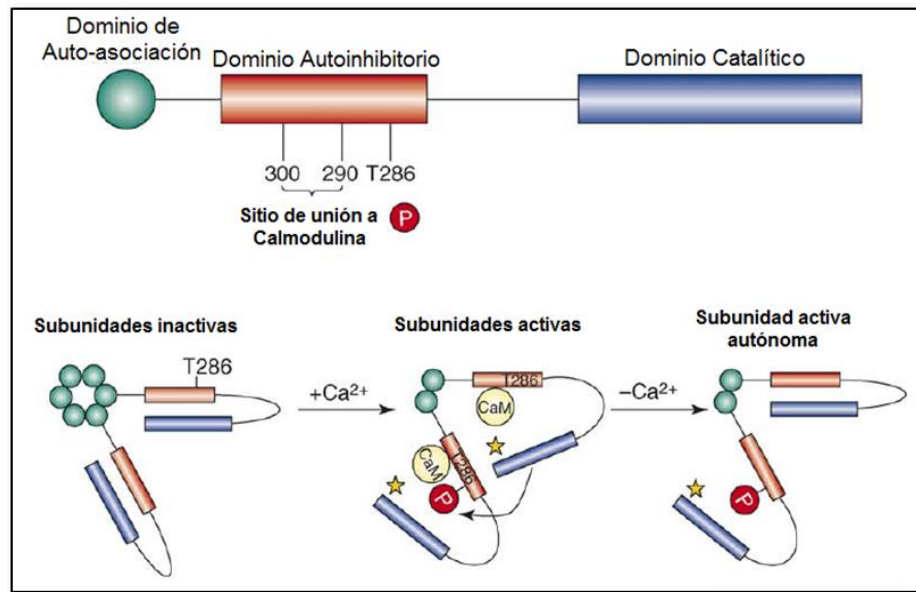


Figura 7. Representación esquemática de la estructura de CaMKII. Se muestran los dominios que conforman a cada subunidad, así como los sitios de unión a calmodulina y el sitio de autofosforilación (arriba). La activación por la entrada de Ca^{2+} hacia la postsinapsis permite los cambios conformacionales que dejan a la subunidad en estado autónomo independiente de Ca^{2+} (abajo) (Modificado de Irvine et al., 2006).

Otro de los mecanismos que han llevado a proponer a CaMKII como un sustrato molecular de la permanencia de la memoria es la capacidad de actuar como etiqueta sináptica. Se sabe que una vez activada por su interacción con el Ca^{2+} , CaMKII se trasloca a la densidad post-sináptica donde se une a los NMDAR, principalmente a la subunidad NR2B, que ha sido implicada directamente con fenómenos plásticos (Bayer et al., 2001; Halt et al., 2012; El Gaamouch et al., 2012; Strack et al., 2000). La unión con la subunidad NR2B también propicia que CaMKII quede en estado autónomo dentro de la espina, de manera que el complejo CaMKII/NR2B es específico de la sinapsis (He et al., 2014; Hell et al., 2014; Lisman y Ragavachari, 2015; Sanhueza et al., 2011, 2013).

2.5. Formación hipocampal

El hipocampo es una estructura paleocortical que tradicionalmente ha sido relacionada con los mecanismos de aprendizaje y memoria. Esta estructura se localiza en la profundidad del lóbulo temporal medial donde recibe información de casi todas las áreas de asociación a través de tres áreas corticales: las cortezas perirrinal, parahipocampal y entorrinal (van Strien et al., 2009). El hipocampo, propiamente dicho, presenta tres subdivisiones, las áreas CA3, CA2 y CA1. Las otras regiones de la formación hipocampal incluyen al giro dentado (GD), el subículus, el presubículus, el parasubículus y la corteza entorrinal. La organización de las conexiones sinápticas en esta estructura consta de un circuito básico llamado circuito trisináptico. La mayoría de la información que proviene de la neocorteza y que llega al hipocampo es enviada por medio de los axones que proyectan a las capas superficiales de la corteza entorrinal (llamada vía perforante) y llegan a las células granulares del GD, estableciendo la primera sinapsis. Posteriormente, los axones de las células granulares envían proyecciones (llamadas fibras musgosas) que arriban a las dendritas apicales de las células piramidales en el área CA3, generando la segunda sinapsis. Finalmente, los axones de las células piramidales en el área CA3 envían proyecciones (llamadas colaterales de Schaffer) que llegan al área CA1, estableciendo la tercera sinapsis (Andersen, 2007). Tanto el hipocampo como el giro dentado constituyen un tejido neuronal que consta de tres estratos laminares. Dichas láminas son la polimórfica (estrato oriens), la piramidal (estrato piramidal) y la molecular (estrato radiado y estrato lagunoso-molecular) (Fernández-Espejo, 1996) (Figura 8).

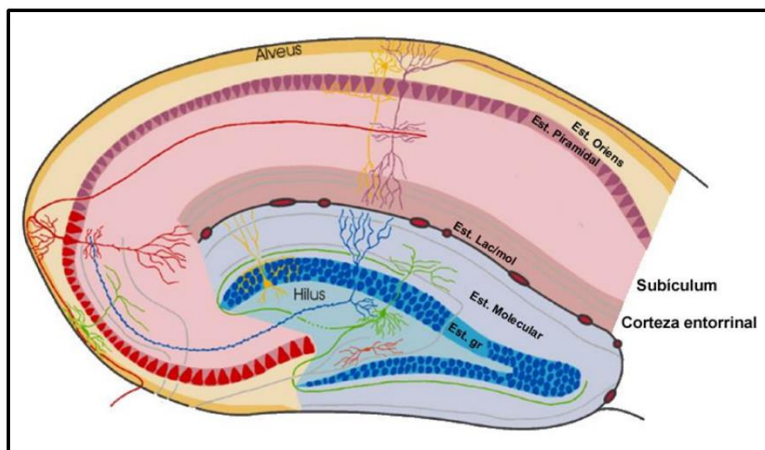


Figura 8. Subdivisión anatómica de la formación hipocampal y su estructura laminar. Diagrama que muestra los estratos hipocampales: estrato oriens, estrato piramidal, estrato radiado, estrato lagunoso-molecular. (Modificado de: Veterinar-Anatomisches Institut. <http://anatomie.vetmed.uni-leipzig.de>).

2.5.1. Fibras Musgosas

Los cambios morfológicos que a menudo acompañan a la plasticidad funcional son considerados una manifestación de la formación del trazo de memoria (Caroni et al., 2012), este efecto puede ser observado claramente en la vía de comunicación que existe entre el giro dentado y el área CA3 del hipocampo. Como se mencionó previamente, las fibras musgosas amielínicas (axones de las células granulares del GD) viajan a través del *hilus*, donde se ramifican hacia la región CA3 del hipocampo y se extienden paralelamente a la capa de células piramidales estableciendo dos tipos de proyecciones: una proyección al haz suprapiramidal (SP-MF) en el estratum lucidum y otra proyección intra e infrapiramidal (IIP-MF) localizada principalmente en el stratum oriens (Witter y Amaral, 2004). Cada axón de las fibras forma tres tipos de terminales presinápticas con diferentes características morfológicas y funcionales: 1) hacia las células piramidales a través de los botones gigantes, 2) con las interneuronas locales a través de los filopodios y 3) las sinapsis en *passant*. Los axones de las FM también forman sinapsis excitatorias con las células musgosas (*mossy cells*) que propagan retrógradamente hacia las células granulares. Adicionalmente, las fibras musgosas excitan directa o indirectamente a través de las células musgosas a las interneuronas positivas a parvalbúmina que proporcionan una inhibición retrógrada hacia las células granulares en distintas láminas a través del eje septo-hipocampal (Jinde et al., 2013; Wiera y Mozrzymas, 2015) (Figura 9). Los botones sinápticos gigantes de las fibras musgosas (3-10 μm de diámetro) establecen contactos con las células musgosas (7-12 contactos por axón) y con las dendritas proximales de las células piramidales del área CA3 (proyección FM-CP, 11-15 botones por axón) (Acsády et al., 1998). Se considera que esta vía de proyección está implicada de manera importante en funciones cognitivas tales como la detección de la novedad, terminación de patrones y parcialmente en la separación de patrones (Kesner, 2013; Yassa y Stark, 2011).

Estas fibras se caracterizan por poseer un alto contenido de péptidos opioides que funcionan como moduladores de esta región (Escobar et al., 1997; Terman et al., 2000; Zhang y Houser, 1999), así como por un alto contenido de zinc en sus botones sinápticos, el cual se libera junto con el glutamato produciendo activación de diversos canales y receptores iónicos (Frederickson et al., 2005). La neurotransmisión excitatoria en las sinapsis de las fibras musgosas depende de la liberación de

glutamato y de la activación postsináptica de receptores a glutamato. Dentro de los canales y receptores que participan en la inducción de la LTP en esta vía se encuentran los receptores de tipo AMPA y kainato (KAr), y los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, específicamente de tipo R (Nicoll y Schmitz, 2005).

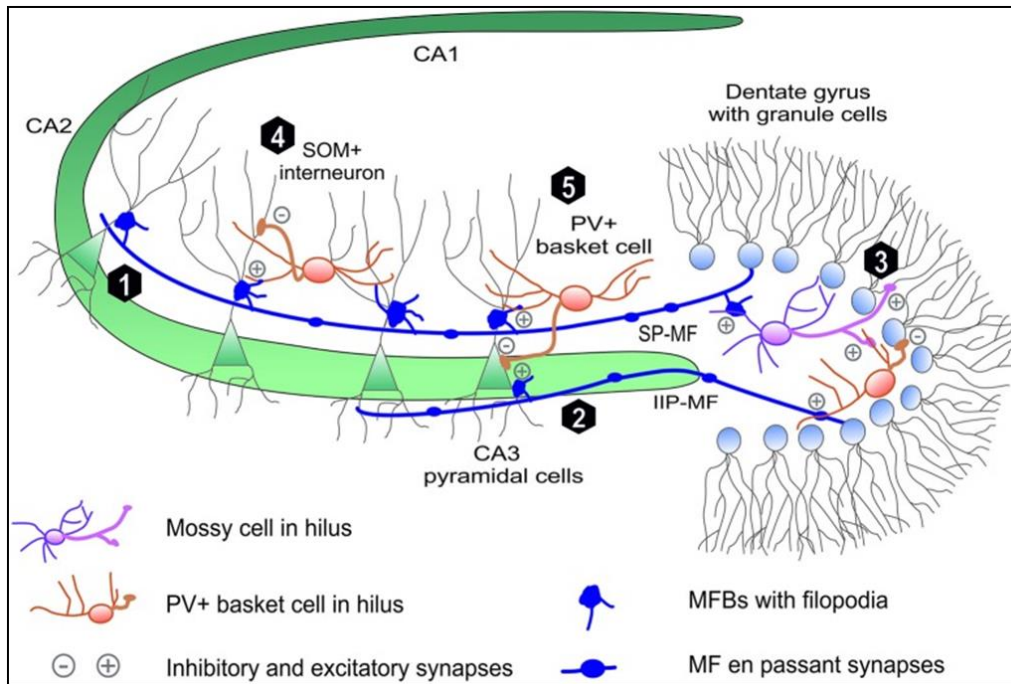


Figura 9. Proyección de las fibras musgosas (FM) hipocampales. La proyección de las fibras musgosas consta de axones procedentes de las células granulares del giro dentado. Los axones de las fibras musgosas proyectan hacia el haz supra piramidal (SP-MF) en el stratum lucidum (1), así como hacia la proyección intra e infra piramidal (IIP-MF) localizada en el stratum oriens (2). En el área CA3 y el hilus establecen tres regiones sinápticas: con las células piramidales a través de los botones musgosos gigantes, con las interneuronas locales a través de los foliopodios y las sinapsis en passant. Y finalmente con el hilus (3), donde los axones de las fibras musgosas establecen sinapsis excitatorias con las células musgosas que propagan retrógradamente a las células granulares. Adicionalmente las FM, directamente o a través de las células musgosas, excitan a las interneuronas locales positivas a parvalbúmina (basket cells) que proporcionan una inhibición retrógrada a las células granulares en distintas láminas a través del eje septo-hipocampal. Las FM en el área CA3 excitan a interneuronas locales que son responsables de la inhibición de las células piramidales del área CA3, las cuales hacen sinapsis en el (5) soma, o en el (4) árbol dendrítico (Wiera y Mozrzymas, 2015).

2.6. Corteza Insular

Aunque el fenómeno de la LTP fue inicialmente descrito en el hipocampo, hoy en día se conoce que está ampliamente distribuido en el sistema nervioso, entre las regiones en las que se ha reportado su presencia destaca la neocorteza, ya que se ha sugerido que es en regiones neocorticales donde se almacena la memoria por periodos prolongados (Kitamura et al., 2017; Wiltgen y Tanaka, 2013).

La corteza insular (CI) es un área neocortical ubicada en el lóbulo temporal lateral y debido a que es el relevo final de la información gustativa y visceral ha sido implicada en la adquisición y almacenamiento del CAS (Bermúdez-Rattoni, 2004; Yiannakas y Rosenblum, 2017). En roedores la CI se localiza a lo largo de la confluencia entre el surco rinal y la arteria cerebral media. Los límites anatómicos de la CI abarcan desde la corteza frontal lateral hasta la corteza perirrinal en dirección rostrocaudal y desde el borde ventral de la corteza piriforme en la dirección dorso-ventral (Figura 10). La CI ha sido dividida en tres áreas que se diferencian por su citoarquitectura: el área granular, el área disgranular y el área agranular. Esta terminología hace referencia a la pérdida progresiva de la capa granular (IV). El área granular se localiza en la parte más dorsal, ha sido relacionada con áreas corticales viscerosensoriales, el área agranular, que se localiza en la parte más ventral, ha sido relacionada con funciones de integración multimodal y límbicas-autonómicas, y el área disgranular, situada entre las dos anteriores, se ha relacionado con distintas modalidades gustativas (Bermúdez-Rattoni, 2014).

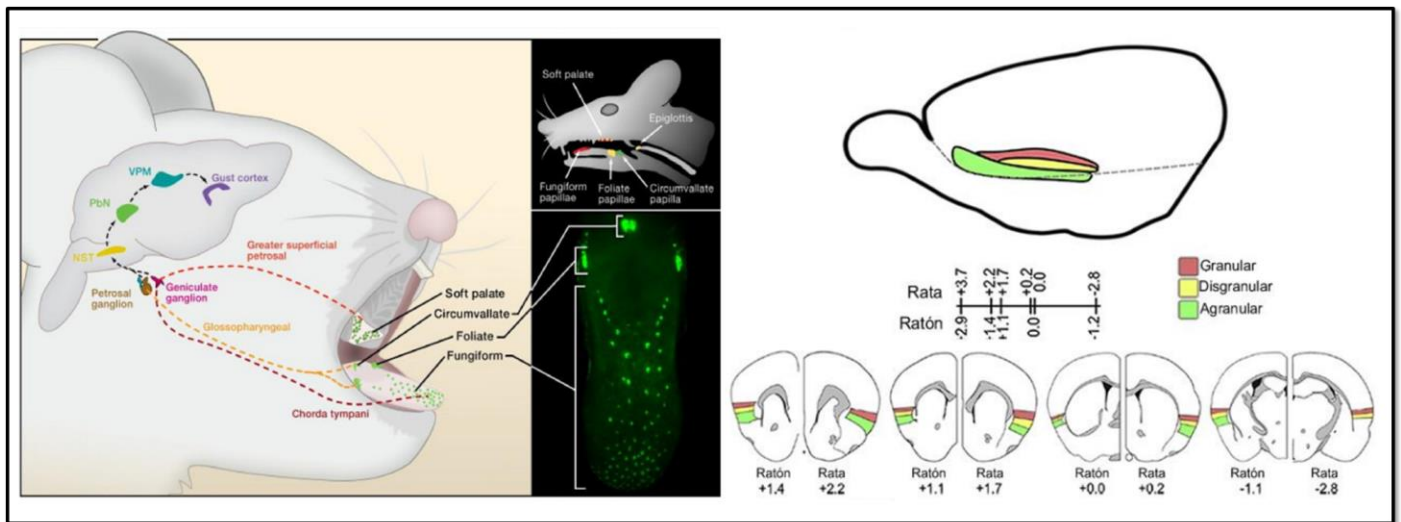


Figura 10. Representación esquemática de la CI de rata. Se muestran las distintas regiones que comprenden a la CI (granular, disgranular y agranular), así como la representación esquemática de secciones coronales a través de distintos niveles en el plano anteroposterior (modificado de Bermúdez-Rattoni, 2014).

2.6.1. Condicionamiento de aversión al sabor

Existen distintos procedimientos a través de los cuales se puede evaluar la permanencia de la memoria, uno de los que se ha estudiado consistentemente es el condicionamiento de aversión a los sabores (CAS).

El CAS es un modelo conductual en el cual un animal adquiere aversión ante un estímulo gustativo novedoso que se asocia con una irritación gástrica (García et al., 1955). Este modelo conductual presenta muchas ventajas ya que el sabor (estímulo condicionado) se asocia con el malestar gástrico (estímulo incondicionado) después de un sólo pareamiento de los estímulos, esto permite tener una ventana clara para observar las fases que conciernen al procesamiento de la información. Además, se conoce con detalle la vía implicada en la percepción y procesamiento de la información que confluye en este tipo de condicionamiento. Numerosos estudios han mostrado que la conexión entre el núcleo basolateral amigdalino (Bla) y la corteza insular (CI) es parte importante de la red neuronal asociada a la formación de la memoria del CAS (Castillo et al., 2006; Castillo et al., 2011; Escobar et al., 1998b; Escobar et al., 2002; Ferreira et al., 2005; Miranda et al., 2003).

Estudios previos de nuestro laboratorio han mostrado que la inducción de LTP en la vía Bla-CI de manera previa al entrenamiento en el CAS modifica la retención de dicha tarea (Escobar et al., 2000).

2.6.2. Integración de la información gustativa y visceral implicada en el CAS

Los sabores son detectados mediante la activación de células receptoras gustativas, que responden a las moléculas disueltas en la saliva. Estas células se encuentran en grupos dentro de la cavidad oral y se distinguen como pequeñas protuberancias llamadas papilas gustativas. Tres pares craneales reúnen la información captada por las papilas gustativas: el facial o VII, el glossofaríngeo o IX y el vago X, estos nervios hacen sinapsis en el núcleo del tracto solitario y posteriormente, en el caso de la rata, hacen relevo en el núcleo parabraquial del puente, desde esta estructura hay proyecciones hacia la amígdala, tanto al núcleo central (Cea) como al Bla; así como a la parte parvocelular del núcleo ventroposteromedial del tálamo.

Por otro lado, la información visceral relacionada con el malestar, es decir el estímulo irritante, es detectada directamente por el nervio vago que proyecta hacia el núcleo del tracto solitario para después hacer relevo en el núcleo parabraquial, la amígdala y el núcleo paraventricular del hipotálamo (Figura 11).

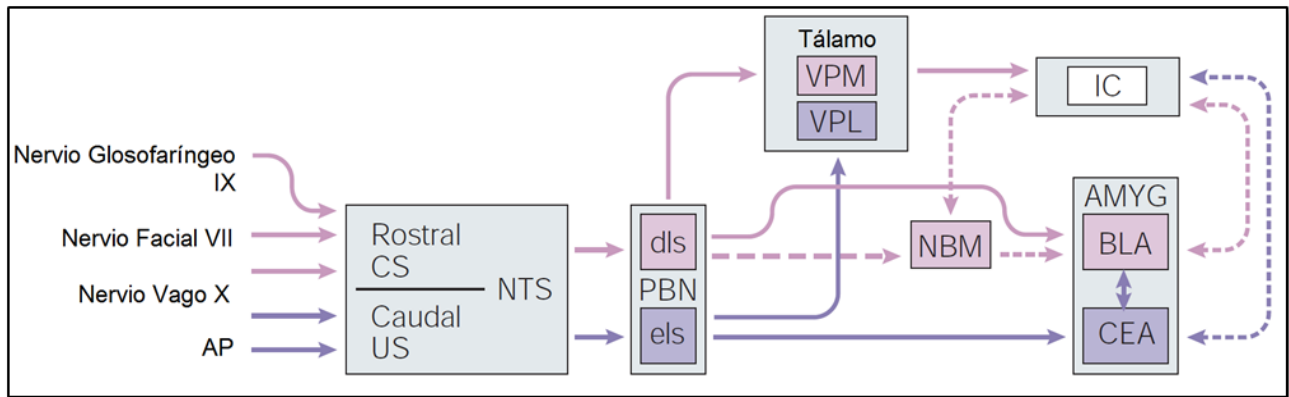


Figura 11. La vía gustativa en ratas. Esquemas donde se muestra la vía gustativa en las ratas. (Abreviaturas: AMYG, amígdala, BLA, núcleo basolateral de la amígdala; CEA, núcleo central de la amígdala; CS, estímulo condicionado; dls, subnúcleo dorsolateral; els subnúcleo exterior lateral; IC, corteza insular; NBM, núcleo basal magnocelular; NTS, núcleo del tracto solitario; PBN, núcleo parabraqueal del puente; US, estímulo incondicionado; VPM, núcleo ventroposteromedial del tálamo; VPL, núcleo ventroposterolateral del tálamo, modificado de Bermúdez-Rattoni, 2004).

Si bien se conocen con detalle las vías neuronales mediante las cuales se procesa la información relativa al CAS, un punto importante a considerar es la participación del relevo final de este procesamiento que involucra las proyecciones de la amígdala basolateral (BLA) hacia la CI. Entre las áreas neocorticales donde se ha reportado la presencia de LTP se encuentra esta proyección BLA-CI (Escobar et al., 1998a; Jones et al., 1999).

2.7. CaMKII en la LTP paleo y neocortical

Distintos hallazgos indican que CaMKII juega un papel esencial en la inducción de la LTP (Appleby et al., 2011; Sanhueza et al., 2007). En áreas paleocorticales por ejemplo, Silva et al. (1992), mostraron una reducción significativa en la probabilidad de inducir LTP tras una estimulación de alta frecuencia en rebanadas de hipocampo de ratones con una mutación específica que impide la expresión de la subunidad α CaMKII. Este hallazgo correlaciona con las observaciones de la conducta en el laberinto acuático de Morris, un paradigma dependiente de hipocampo, donde los ratones *knockout* para la subunidad α CaMKII tuvieron una pobre retención de la memoria relacionada con esta tarea (Silva et al., 1992). Estas investigaciones muestran la importancia de la integridad de la subunidad α CaMKII para la inducción de LTP.

En cuanto al papel de CaMKII en la LTP neocortical, Frankland et al., (2001) llevaron a cabo registros electrofisiológicos en rebanadas de corteza de ratones *knockout* para la subunidad α CaMKII, observando deficiencias similares a las reportadas por Silva et al. (1992) al examinar la capacidad de inducir LTP en la corteza visual y temporal, que además fueron correlacionadas con deficiencias en el mantenimiento de la asociación establecida en una tarea de condicionamiento al miedo. En un estudio reciente se demostró que la expresión transitoria de una forma negativa dominante de CaMKII produce un deterioro de una memoria dependiente del hipocampo previamente establecida. Este hallazgo refuerza la idea de que CaMKII juega un papel importante en el mantenimiento de la memoria (Rossetti et al., 2017).

Recientemente, se ha propuesto que CaMKII no sólo tiene injerencia en la inducción de LTP, sino que juega un papel esencial en el mantenimiento de este fenómeno de plasticidad sináptica mediante la formación del complejo CaMKII-NMDAr (Barria y Manilow, 2005, Sanhueza et al., 2011, Sanhueza y Lisman, 2013). A este respecto, algunas investigaciones señalan que la formación del complejo CaMKII/NMDAr es esencial en el mantenimiento del incremento de la fuerza sináptica. Inicialmente se probó que CaMKII podía interactuar con los receptores NMDA, al identificar a un segmento de la subunidad NR2B como sustrato de una forma purificada de CaMKII (Omkumar et al., 1996). Posteriormente, se encontró que el complejo CaMKII/NMDAr está presente en neuronas corticales mediante la co-inmunoprecipitación de PSDs (Strack y Colbran, 1998). En este estudio además se probó que la cantidad del complejo aumenta debido a la activación del receptor NMDA, el posterior flujo de Ca^{2+} y la autofosforilación en el residuo T286.

Además de las condiciones que generan la formación del complejo CaMKII/NMDAr, se ha explorado su relevancia para la expresión de plasticidad sináptica. Así, Barria y Malinow (2005) generaron un constructo de la subunidad NR2B que presentaba una mutación capaz de disminuir la capacidad de unión con CaMKII. Sus hallazgos mostraron que la interferencia en la formación del complejo produjo un decremento significativo de la LTP en la región CA1 del hipocampo. Efectos similares se han observado en rebanadas de hipocampo de ratones con mutaciones puntuales para impedir la unión de CaMKII con la subunidad NR2B (Halt et al., 2012), o bien cuando se genera una mutación en el extremo C-terminal de la subunidad que impide la interacción del receptor con la cinasa

(Zhou et al., 2007). Además de las maniobras genéticas el desarrollo de fármacos derivados de inhibidores endógenos ha permitido evaluar farmacológicamente el papel que tiene la formación del complejo CaMKII/NMDAR en la plasticidad sináptica. En particular el inhibidor CaMKIINtide se une al sitio T de la cinasa que es el lugar en el que se produce la asociación con la subunidad NR2B de los receptores NMDA (Chang et al., 1998). Sanhueza y colaboradores, mostraron que la aplicación de una versión más corta del inhibidor (CN21) puede revertir la LTP en rebanadas de hipocampo (Sanhueza et al., 2011).

3. Planteamiento del problema

La permanencia es una característica central de la memoria para la supervivencia de los organismos. La LTP ha contribuido de manera sustancial al estudio de la memoria y gracias al estudio de este fenómeno se han podido dilucidar las bases moleculares que subyacen a su consolidación. Sin embargo, poco se sabe respecto a los procesos moleculares que determinan que una memoria se mantenga por periodos prolongados. Recientemente, se ha propuesto a la proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina tipo II (CaMKII) como una molécula central en el mantenimiento de la LTP y por lo tanto de la memoria, aunque el conocimiento al respecto es aún incipiente.

4. Objetivos

- Explorar el papel que desempeña CaMKII en el mantenimiento de la LTP en la vía de las fibras musgosas hipocampales y en la reorganización sináptica característica de dicha región.
- Explorar el papel que desempeña CaMKII en el mantenimiento de la LTP en la vía Bla-CI y de la MLP del CAS.

5. Procedimiento experimental general

5.1. Sujetos

Para el presente estudio se emplearon 112 ratas macho de la cepa Wistar con pesos de 360-380 g, que fueron alojadas en cajas individuales de policarbonato, en un ciclo de luz-obscuridad 12h/12h a una temperatura promedio de 21°C, con comida y agua *ad libitum* (excepto en las fases experimentales que especifiquen lo contrario).

5.2. Papel de CaMKII en el mantenimiento de la plasticidad sináptica paleocortical

5.2.1. Registros electrofisiológicos

Durante los procedimientos electrofisiológicos, los animales fueron anestesiados con pentobarbital (50 mg/kg. i.p.), suministrando inyecciones suplementarias del mismo (25 mg/kg) a intervalos de 1 h a fin de mantener los niveles quirúrgicos de anestesia. La temperatura corporal de los animales fue mantenida a 35°C mediante un cojín homeotérmico. Con el fin de analizar el efecto de la inhibición de CaMKII en el mantenimiento de la plasticidad sináptica en las fibras musgosas hipocampales se efectuaron registros electrofisiológicos *in vivo*. Brevemente, las respuestas fueron registradas utilizando un electrodo monopolar de infusión colocado en el estrato lúcido, en la capa suprapiramidal del área CA3 del hipocampo dorsal (Figura 5), siguiendo las coordenadas estereotáxicas de: AP -2.9 mm; ML +2.2 mm; DV -3.0 mm (Paxinos y Watson, 2007). Los electrodos de registro/infusión fueron contruidos con una cánula guía de calibre 33 de acero inoxidable cubierta con un aislante, conectado a un cable de acero inoxidable cubierto de teflón (0.005", Medwire, Chicago IL). Este electrodo se acopló en su parte superior a una manguera de polietileno acoplada a su vez a una jeringa Hamilton de 10 µl comandada por una bomba de microinfusión. Las respuestas fueron evocadas a través de la estimulación directa del giro dentado, empleando un electrodo bipolar de acero inoxidable (diámetro 0.005") colocado en las siguientes coordenadas estereotáxicas: AP -3.5 mm; ML -2.0 mm; DV -3.1 mm (Paxinos y Watson, 2007). La estimulación (pulsos monofásicos de 20-40 µA y 0.1-0.25 ms de duración) fue suministrada por medio de un estimulador Grass S48, llevada al electrodo por una unidad de aislamiento PSIU6. Las respuestas evocadas fueron amplificadas utilizando un amplificador Grass P5, filtradas a 0.1-10 Hz, la señal fue digitalizada (10 puntos/s) para su almacenamiento y análisis en una microcomputadora provista del

software BrainWave (Datawave Co.). Las respuestas evocadas de las fibras musgosas fueron medidas obteniendo la pendiente de los potenciales postsinápticos excitatorios (PPSE) de campo medidos 1-3 milisegundos después del comienzo de los PPSE. La intensidad de la corriente que producía un 50% del máximo de respuesta fue determinada y se utilizó para la subsiguiente estimulación. Se tomó una línea base de 30 min evocando respuestas cada 20 s, después de los cuales se administró la estimulación de alta frecuencia (HFS). Dos horas después se administró el inhibidor selectivo de CaMKII (myr-CaMKIINTide) o vehículo (líquido céfalo raquídeo artificial, ACSF por sus siglas en inglés). Se continuó el registro por una hora más y el agonista del receptor metabotrópico a glutamato tipo II, 2-(2,3-dicarboxi-ciclopropil) glicina (DCG-IV; 0.5 μ l a una concentración de 5 μ M infundido en 5 min) fue administrado al final del registro electrofisiológico con el fin de verificar que la señal obtenida fue en efecto generada por las fibras musgosas hipocampales.

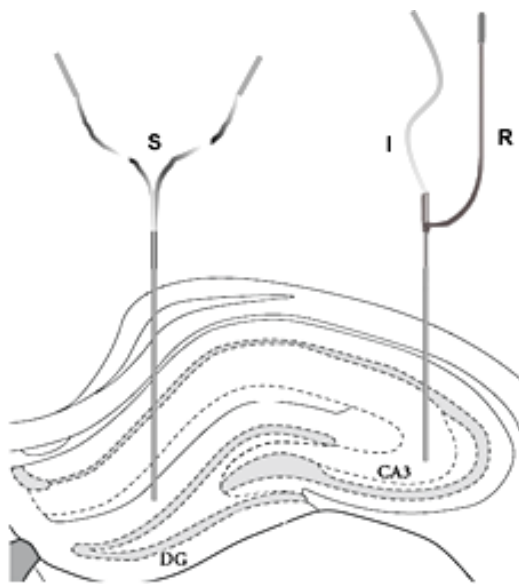


Figura 12. Representación esquemática de cortes coronales de cerebro de rata mostrando el arreglo de electrodos utilizado para el registro electrofisiológico (S: estimulación, R: registro).

5.2.2. Técnica histoquímica de Timm

La técnica histoquímica de Timm para la detección de metales pesados consiste en la reducción de metales pesados libres con sulfuro de sodio, cuyo producto se combina posteriormente con nitrato de plata y se somete a un proceso de revelado análogo al fotográfico, lo que conduce a la formación de plata metálica que puede ser visualizada. Siete días después del registro electrofisiológico los animales fueron perfundidos transcárdialmente con 500 ml de una solución acuosa de sulfuro de sodio al 0.4%,

seguida de 500 ml de una solución de paraformaldehído al 1% y glutaraldehído al 1.25%. Después de terminada la perfusión los cerebros fueron extraídos de la cavidad craneana y se colocaron en la solución fijadora. Los cerebros fueron transferidos a una solución de sucrosa al 30% en PBS 0.1M (pH 7.4) en la cual se conservaron a 4°C durante 48 horas. Los cerebros fueron cortados por congelación en secciones coronales de 40 μ m, montados en portaobjetos cubiertos con gelatina y revelados en oscuridad en una mezcla 12:6:2 de goma arábica (20%), hidroquinona (5.6%), buffer de citratos y 1 ml de una solución al 17% de nitrato de plata.

5.2.3. Análisis histológico

Los cortes procesados con la técnica histoquímica de Timm fueron examinados por microscopía de luz con el propósito de evaluar la presencia y distribución de los gránulos de Timm, que a su vez revelan la distribución de los botones sinápticos (Rekart et al., 2007). Así, el uso de la técnica histoquímica de Timm revela la alta concentración de zinc en los botones gigantes de las fibras musgosas (Frederickson et al., 1983), evidenciando la organización laminar de la arquicorteza. Esta evidencia ha sido corroborada recientemente por imágenes de resonancia magnética, las cuales revelan incrementos en el área CA3 del hipocampo, generados por el entrenamiento en el laberinto acuático de Morris, correlacionados con incrementos en la región estrato oriens/estrato piramidal observados con la técnica histoquímica de Timm (Zhang et al., 2016).

Para el análisis histológico, se eligió un corte de cada cinco secciones por animal (AP -3.2 a 3.5) a partir del polo septal del hipocampo dorsal. El área CA3 de estas secciones coronales fue captada por una cámara digital (Coolpix 5000, Nikon, Tokio, Japón) conectada al microscopio óptico (Eclipse E600, Nikon, Tokio, Japón). Estas imágenes fueron ecualizadas con los mismos parámetros de brillo y contraste (Adobe Photoshop CS). Las imágenes digitales fueron analizadas con un programa de análisis de imágenes (Scion Image, Scion Co., Frederick MD) como ha sido reportado con anterioridad (Ramírez-Amaya et al., 2001). Brevemente en cada imagen se mide el área de gránulos de Timm con un área de densidad óptica de entre los 120-255 puntos en escala de grises (32 bits).

Estos resultados fueron corroborados mediante una metodología reportada anteriormente en la observación de este tipo de modificaciones morfológicas (Rekart et al., 2007). Para ello, se realizaron

medidas del área de interés a través de una rejilla de conteo (cuadros= 25 μ m por lado) que fue digitalmente superpuesta en las imágenes. Posteriormente se encontraron las intersecciones de la rejilla pertenecientes al SL o SOSP que contaban con un oscuro precipitado por Timm. Cuando se obtuvieron las medidas por ambas metodologías (mediante Scion Image y con la rejilla reportada por Rekart y cols. 2007) se realizaron comparaciones entre grupos utilizando la proporción del área estimada de SOSP entre el área SL para tomar en consideración cualquier diferencia en el tamaño de los hipocampos entre animales.

5.2.4. Western Blot

Con la finalidad de analizar el estado de fosforilación de CaMKII en presencia del inhibidor (myrCaMKIINtide), tres animales de los grupos HFS+ACSF y HFS+Ntide fueron decapitados y el área CA3 registrada fue microdisectada 130 min después de la administración de HFS (i.e. 10 min después de la administración de myr-CaMKIINtide). Los tejidos fueron homogeneizados subsecuentemente en una solución amortiguadora de lisis (50mM Tris-HCl pH 6.8, 20mM NaCl, 2mM EDTA, 10% glycerol, 10% triton) suplementada con 10mM de inhibidor de proteasas (Mini Complete, Roche, Mannheim, Germany); así como con inhibidores de fosfatasas (50mM NaF, 4mM Na₃VO₄, 10mM NaPPi). Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 14 000 rpm por 20 min a 4°C y se colectó el sobrenadante. La concentración de proteína fue medida usando el ensayo de Bradford utilizando suero bovino como proteína estándar.

Las muestras de proteínas se separaron mediante electroforesis vertical en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Una cantidad equivalente de proteína para cada muestra fue cargada en geles de SDS-acrilamida 10%. Una vez concluida la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Thermo, Rockford, Illinois, EUA). Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas durante 90 min en una solución amortiguadora TBST (solución salina amortiguada con Tris 0.01%, Tween-20, pH 7.4) adicionada con 5% de leche sin grasa y se incubaron con los anticuerpos primarios anti phospho-CaMKII (1:1000, Millipore, Darmstadt, Germany) para la detección de la forma fosforilada de CaMKII y con anti-CaMKII (1:1000, Gibco, BRL, IL) para el total de CaMKII durante toda la noche a 4° C. A continuación, las membranas se incubaron con anti-IgG de conejo (1:2000, Cell Signaling

Technology, Massachusetts, EUA) o anti-IgG de ratón (1:2000, Cell Signaling Technology, Massachusetts, EUA) durante 2 h. Las bandas inmunorreactivas se detectaron mediante el kit de bioluminiscencia ratón.

El análisis densitométrico de las bandas se realizó utilizando el programa Image J 1.49 (NIH, Bethesda, Maryland, EUA). La forma fosforilada fue normalizada al total de CaMKII como una proporción, que se presenta mediante un valor de porcentaje en el histograma.

5.3. Papel de CaMKII en el mantenimiento de la plasticidad sináptica neocortical

5.3.1. Registros electrofisiológicos

Con el fin de analizar el efecto de la inhibición de CaMKII en el mantenimiento de la plasticidad sináptica en la vía Bla-CI se efectuaron registros electrofisiológicos *in vivo*. Los registros electrofisiológicos se llevaron a cabo de manera similar a lo descrito en la sección anterior a excepción de que las respuestas fueron registradas unilateralmente en la región agranular de la corteza insular utilizando un electrodo monopolar de infusión colocado en las coordenadas AP +1.2mm, ML 5.5 mm, DV -5.5mm (Paxinos y Watson, 2007) y las respuestas fueron evocadas a través de la estimulación directa en el núcleo basolateral amigdalino, en las coordenadas AP -2.8mm, ML -5.0mm, DV -8.5±0.2mm (Paxinos y Watson, 2007) (figura 13). Las fases de línea base, infusión y registro post-infusión se llevaron a cabo de la misma manera. La estimulación de alta frecuencia capaz de inducir LTP consistió en 10 trenes de 100 Hz/1 s cada 20 s.

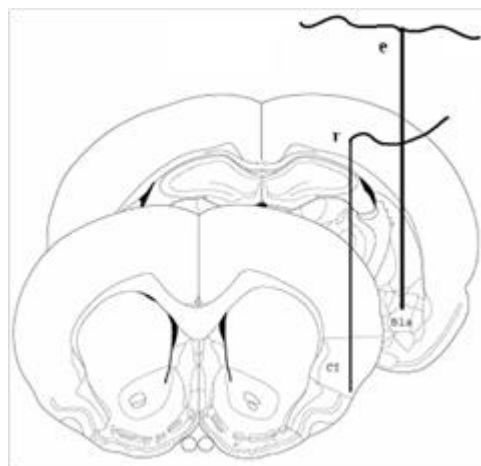


Figura 13. Representación esquemática de cortes coronales de cerebro de rata mostrando el arreglo de electrodos utilizado para el registro electrofisiológico (e - estimulación, r - registro).

5.3.2. Western Blot

De manera similar a lo descrito previamente, se realizó un análisis del estado de fosforilación de CaMKII en presencia del inhibidor, para ello se microdisectó la corteza insular de tres animales de los grupos HFS+ACSF y HFS+Ntide. Los tejidos fueron tratados de acuerdo con lo descrito previamente y se llevó a cabo la electroforesis vertical de las muestras. Las proteínas fueron transferidas a membranas que fueron bloqueadas y posteriormente incubadas con los anticuerpos primarios anti phospho-CaMKII T286/287 (1:1000, Millipore, Darmstadt, Germany) y anti-CaMKII (1:500, Santa Cruz, CA, USA) durante toda la noche a 4°C. A continuación, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes y se detectaron las bandas inmunorreactivas. El análisis densitométrico de las bandas se realizó de manera similar a lo descrito, obteniendo las densidades para las isoformas α y β de CaMKII. Las formas fosforiladas fueron normalizadas al total de CaMKII como una proporción, que se presenta mediante un valor de porcentaje en el histograma, de manera similar a lo descrito previamente.

5.3.3. Implantación de cánulas en la corteza insular (CI)

El procesamiento quirúrgico de los sujetos se llevó a cabo utilizando procedimientos estereotáxicos convencionales y consistió en la implantación bilateral de guías cánula de acero inoxidable de 1 cm de largo y .022 pulgadas de calibre (bajo el efecto de anestesia Pentobarbital (Nembutal) 50mg/kg; vía intraperitoneal). Las coordenadas empleadas para corteza insular fueron AP= +1.2 mm; ML= + 5.5 mm; DV= -5.5 mm (Paxinos y Watson, 2007). Los extremos de las guías cánula fueron colocados 5 mm arriba de la CI y fijadas al cráneo usando acrílico dental de secado rápido. Un estilete de alambre de acero inoxidable se colocó en el interior de las cánulas con el fin de proteger su luz de obstrucciones con material orgánico durante el periodo de entrenamiento. Después de la cirugía se dejó transcurrir un periodo post-operatorio de siete días (Blanco et al., 2019; Castillo et al., 2006; Moguel-González et al. 2008; Rodríguez-) antes de continuar con las manipulaciones conductuales.

5.3.4. Microinfusiones

Los sujetos una vez canulados fueron infundidos bilateral e intraparenquimalmente en la región correspondiente a la CI. Las microinyecciones fueron administradas por microinyectores consistentes en agujas dentales de calibre 30. El microinyector fue introducido en la cánula previa remoción del estilete

y se extendió 3 mm por debajo del extremo inferior de la cánula, alcanzando así la región correspondiente a la CI bilateralmente. Los microinyectores fueron conectados mediante tubos de polietileno a jeringas Hamilton de 10 μ l. Las microinyecciones fueron dosificadas mediante una bomba de microinfusión (Carnegie Medicin, MA). Una vez inyectado el volumen total del fármaco o del vehículo, protocolo experimental, los microinyectores permanecieron insertos durante un minuto más para asegurar la adecuada difusión de la solución en el tejido.



Figura 14. Representación esquemática de un corte coronal de cerebro de rata mostrando los sitios de canulación y microinyección.

5.3.5. Condicionamiento de aversión al sabor

Al inicio del entrenamiento en el CAS, los animales fueron privados de agua por 24 horas. Posteriormente, se les entrenó para beber agua dos veces al día (10:00 y 18:00 horas) durante 10 min por cada sesión de entrenamiento en un periodo de tres días durante los cuales se estableció la línea base de consumo. Los bebederos fueron probetas graduadas cubiertas con tapones de caucho horadados con boquillas de metal. El día de la adquisición los animales fueron privados de alimento y se sustituyó el agua por un sabor novedoso, solución de sacarina al 0.1% (Sigma, WI). Después de 10 min de la presentación del estímulo novedoso, se administró una dosis intraperitoneal de cloruro de litio (0.2 M; 9.37 ml/Kg) para inducir el malestar digestivo. Después de la sesión de adquisición, se proporcionó de nueva cuenta agua dos veces al día con el fin de restablecer la línea base de consumo de agua. Una vez restablecida la línea base el agua, ésta se sustituyó nuevamente por la solución de sacarina 0.1% durante la prueba de aversión.

5.3.6. Histoquímica de Nissl

Una vez finalizados los registros electrofisiológicos o la manipulación conductual, se llevó a cabo el análisis histoquímico con el fin de observar la ubicación exacta de los electrodos o de las cánulas. Para ello los animales fueron perfundidos transcárdialmente con 500 ml de solución salina, seguida por 500 ml de solución fijadora (paraformaldehído 4%; glutaraldeído 0.2% en amortiguador de fosfatos 0.1M / pH 7.4). Después de terminada la perfusión los cerebros fueron extraídos de la cavidad craneana y se colocaron en la solución fijadora. Los cerebros fueron transferidos a una solución de sucrosa al 30% en PBS 0.1M (pH 7.4) en la cual se conservaron a 4°C durante 48 h. Se colectaron en amortiguador de fosfatos secciones coronales de 40 μ m, las cuales se obtuvieron a través de un microtomo de congelación (LEICA RM 2000R). Las muestras se tiñeron con violeta de cresilo y se examinaron en un microscopio de luz, con el fin de verificar la posición exacta de las cánulas en el cerebro de la rata.

5.4. Diseño experimental

5.4.1. Papel de CaMKII en el mantenimiento de la plasticidad sináptica de la vía FM-CA3

Debido a que la participación de CaMKII en el mantenimiento de la LTP ha sido poco explorado, contemplamos investigar el papel que desempeña CaMKII en el mantenimiento de la LTP de la vía de las FM (Figura 15). A continuación, se describen los grupos experimentales.

- **HFS:** Las ratas fueron sometidas a los registros electrofisiológicos previamente descritos. Tras el establecimiento de una línea base de treinta minutos se aplicó la estimulación de alta frecuencia (HFS, por sus siglas en inglés) capaz de inducir LTP y se registraron las respuestas evocadas por tres horas más.
- **HFS + CaMKIIntide:** Las ratas fueron sometidas a los registros electrofisiológicos según lo descrito para el grupo HFS, dos horas posteriores a la estimulación se llevó a cabo la microinfusión unilateral del inhibidor (5 μ M/ μ l ACSF/1 μ l/min/ hemisferio, Gomez-Monterrey et al., 2013; Schmitt et al., 2004; Sanhueza et al., 2007) en el área CA3 del hipocampo y se registraron las respuestas evocadas por una hora más.

- **HFS + ACSF:** Las ratas fueron sometidas a los registros electrofisiológicos en las mismas condiciones que el grupo HFS + CaMKIIntide, 2h posteriores a la estimulación se llevó a cabo la microinfusión unilateral del vehículo (líquido cefalorraquídeo artificial, ACSF).
- **BL + CaMKIIntide:** Las ratas fueron sometidas a los registros electrofisiológicos previamente descritos. Tras el establecimiento de una línea base de 30 min se realizó la microinfusión unilateral del inhibidor y se registraron las respuestas evocadas por 3 h más.

Para todos los grupos, siete días después de los registros electrofisiológicos *in vivo* se llevó a cabo la obtención de los cerebros para procesarlos mediante la técnica histoquímica de Timm; un grupo más sin previa manipulación fue introducido al procesamiento como control intacto (CON).

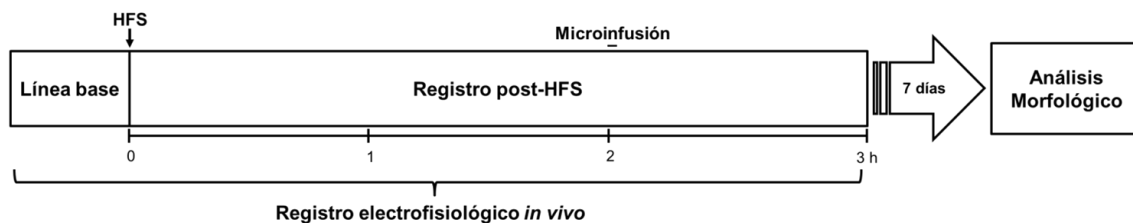


Figura 15. Diagrama de flujo correspondiente al procedimiento experimental.

5.4.2. Papel de CaMKII en el mantenimiento de la plasticidad sináptica de la vía Bla-CI

5.4.2.1. Fase A

Como se planteó previamente la participación de CaMKII en el mantenimiento de la LTP ha sido poco explorada, por ello contemplamos además evaluar el papel de CaMKII en el mantenimiento de la LTP de la vía Bla-CI (Figura 16). A continuación, se describen los grupos experimentales.

- **HFS:** Las ratas fueron sometidas a los registros electrofisiológicos previamente descritos. Tras el establecimiento de una línea base de 30 min se aplicó la estimulación de alta frecuencia (HFS) capaz de inducir LTP y se registraron las respuestas evocadas por 3 h más.
- **HFS + CaMKIIntide:** Las ratas fueron sometidas a los registros electrofisiológicos según lo descrito para el grupo HFS, 2 h posteriores a la estimulación se llevó a cabo la microinfusión unilateral del inhibidor (5 $\mu\text{M}/\mu\text{l}$ ACSF/1 $\mu\text{l}/\text{min}$ / hemisferio, Gomez-Monterrey et al., 2013; Schmitt et al., 2004; Sanhueza et al., 2007) en la CI y se registraron las respuestas evocadas por una hora más.

- **HFS + ACSF:** Las ratas fueron sometidas a los registros electrofisiológicos en las mismas condiciones que el grupo HFS + CaMKIIntide, recibiendo la microinfusión unilateral del vehículo (líquido cefalorraquídeo artificial, ACSF).
- **BL + CaMKIIntide:** Las ratas fueron sometidas a los registros electrofisiológicos previamente descritos. Tras el establecimiento de una línea base de 30 min se llevó a cabo la microinfusión unilateral del inhibidor y se registraron las respuestas evocadas por 3 h más.

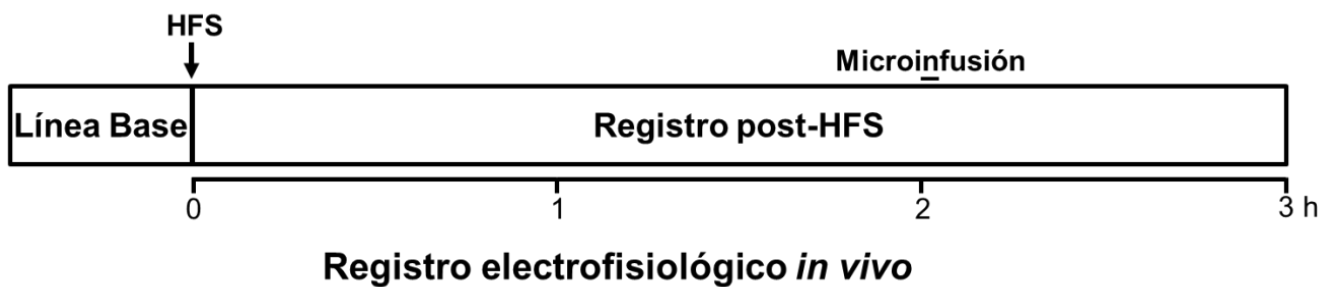


Figura 16. Diagrama de flujo correspondiente al procedimiento de la Fase A.

5.4.2.2. Fase B

Debido a que la participación de CaMKII en el mantenimiento de la MLP aún no ha sido esclarecida, contemplamos investigar el papel que desempeña CaMKII en el mantenimiento de la MLP del CAS (Figura 17). A continuación, se describen los grupos experimentales.

- **CAS + MCP + CaMKIIntide:** Las ratas se entrenaron en el CAS de acuerdo con lo descrito anteriormente. Para este grupo se realizó una prueba de memoria de corto plazo (MCP) cuatro horas y media después de la adquisición (Ferreira et al., 2002, Moguel-González et al., 2008), con el fin de corroborar que la asociación entre el estímulo gustativo novedoso y la irritación gástrica se estableciera. Veinticuatro horas después de la adquisición, las ratas recibieron una microinfusión intracortical bilateral del inhibidor selectivo de CaMKII, myr-CaMKIIntide (5 μ M/ μ l ACSF/1 μ l/min/hemisferio, Gomez-Monterrey et al., 2013; Schmitt et al., 2004; Sanhueza et al., 2007) en la CI. Cuarenta y ocho horas después de la microinfusión se llevó a cabo la segunda prueba de aversión, con el propósito de evaluar el efecto de myr-CaMKIIntide sobre la memoria del CAS.

- CAS + MCP + ACSF:** Las ratas fueron entrenadas en el CAS, cuatro horas y media después de la sesión de adquisición fueron sometidas a la prueba de MCP (Ferreira et al., 2002; Moguel-González et al., 2008). Veinticuatro horas después de la sesión de adquisición las ratas recibieron una microinfusión intracortical bilateral de vehículo (1 μ l ACSF/1 min/ hemisferio) en la CI. Cuarenta y ocho horas después de la microinfusión se realizó la prueba de aversión.
- CAS + CaMKIIntide:** Las ratas fueron entrenadas en el CAS y 24 h después de la adquisición (en ausencia de la prueba de MCP con el fin de evitar la interferencia inherente al proceso de evocación, Nader y Einarsson, 2010), las ratas recibieron una microinfusión intracortical bilateral del inhibidor selectivo de CaMKII, myr-CaMKIIntide (10 μ M/ μ l ACSF/1 μ l/min/ hemisferio, Gomez-Monterrey et al., 2013; Schmitt et al., 2004; Sanhueza et al., 2007) en la CI. Cuarenta y ocho horas después de la microinfusión se llevó a cabo la prueba de aversión, con el propósito de evaluar el efecto de myr-CaMKIIntide sobre la memoria del CAS.
- PseudoCAS + CaMKIIntide:** Las ratas fueron pseudoentrenadas en el CAS substituyendo al LiCl por PBS durante la sesión de adquisición. Veinticuatro horas después de la adquisición (en ausencia de la prueba de MCP con el fin de evitar la interferencia inherente al proceso de evocación, Nader y Einarsson, 2010), las ratas recibieron una microinfusión intracortical bilateral del inhibidor selectivo de CaMKII, myr-CaMKIIntide (10 μ M/ μ l ACSF/1 μ l/min/ hemisferio, Gomez-Monterrey et al., 2013; Schmitt et al., 2004; Sanhueza et al., 2007) en la CI. Cuarenta y ocho horas después de la microinfusión se llevó a cabo la prueba de aversión, con el propósito de evaluar el efecto de myr-CaMKIIntide sobre la memoria del CAS.

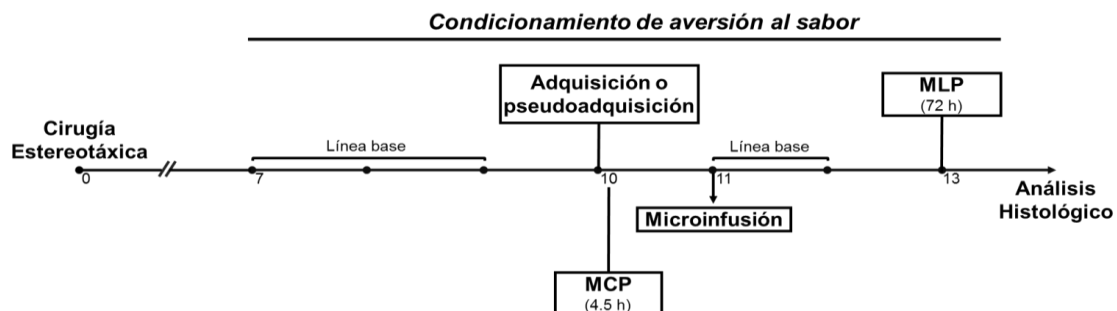


Figura 17. Diagrama de flujo correspondiente al procedimiento de la Fase B.

6. Resultados

6.1. CaMKII en el mantenimiento de la plasticidad sináptica de la vía FM-CA3

El análisis histológico confirmó la correcta colocación de los electrodos (Figura 18), las ratas en las que tal criterio no se cumplió fueron excluidas de los análisis subsecuentes.

Los EPSPs registrados en el área CA3 consistieron en potenciales de 0.40 ± 0.01 mV (media \pm EEM), producidos por pulsos de corriente de 20–40 μ A de 0.1– 0.25 ms duración. Estas respuestas iniciaron 1.2–3.1 ms después de la estimulación y presentaron su valle a los 6.8 ms con una pendiente promedio de 0.63 ± 0.01 (media \pm EEM; Fig 18). La microinfusión al final de los registros electrofisiológicos bloqueó selectivamente las respuestas de las FM a un 22% respecto a las señales obtenidas durante la estimulación basal, presentando potenciales de 0.27 ± 0.01 mV (media \pm EEM), con una pendiente de 0.14 ± 0.01 (media \pm EEM), verificando que la señal fue generada por las entradas de las FM (figura 18).

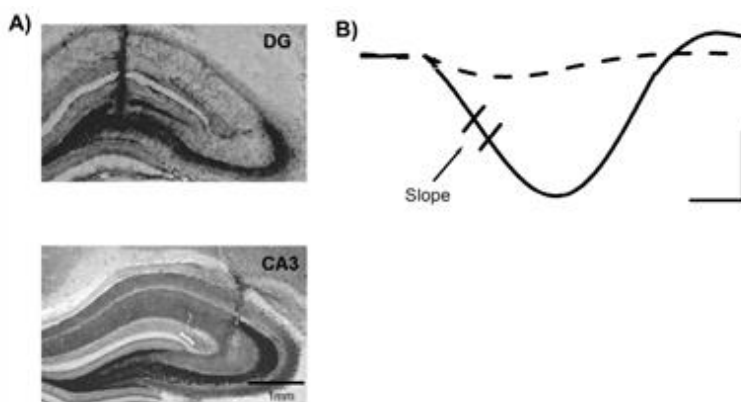


Figura 18. A) Imágenes representativas de la colocación de los electrodos que muestra los sitios de estimulación y de registro e infusión en un plano coronal. DG: Giro dentado. Escala: 1mm. B) Trazos representativos de los PPSEs obtenidos durante la línea base (línea sólida) y después de la aplicación de DCG-IV (línea punteada). La aplicación de DCG-IV bloquea selectivamente las respuestas de las FM. Se muestra el sitio de medición de la pendiente (slope). Escala: 5ms y 0.10 mV.

6.1.1. La inhibición de la fosforilación de CaMKII revierte la LTP en la vía FM-CA3

La estimulación de alta frecuencia produjo un incremento en la pendiente de los EPSP del CA3 que inició aproximadamente 20 min después de la estimulación, alcanzando una meseta estable 1 h después de la estimulación y que duró por lo menos durante 3 h. La aplicación de myr-CaMKIINtide (5 μ g/1 μ l) en la región CA3 (grupo HFS+Ntide) bloqueó la fase de mantenimiento de la potenciación sináptica cuando el

inhibidor fue aplicado 2 h después de la estimulación de alta frecuencia (Figura 19), mientras que la infusión de ACSF (1 μ l, grupo HFS+ACSF) no tuvo efecto sobre la fase de mantenimiento de la LTP. De manera importante, no se observó ningún efecto cuando el inhibidor fue aplicado sin estimulación previa (grupo BL+Ntide). El ANOVA para el incremento de la pendiente reveló diferencias altamente significativas entre los grupos ($F_{3,24}=27.255$; $P < 0.001$). El análisis post-hoc con la prueba de Fisher mostró diferencias significativas entre el grupo HFS+Ntide y los demás grupos que recibieron HFS ($p < 0.001$). Una hora después de la infusión los porcentajes de los EPSPs (\pm EEM) para los grupos HFS, HFS+Ntide, HFS+ACSF y BL+Ntide fueron 152.43 ± 0.52 , 106.21 ± 0.79 , 156.79 ± 0.88 y 94.94 ± 0.55 respectivamente.

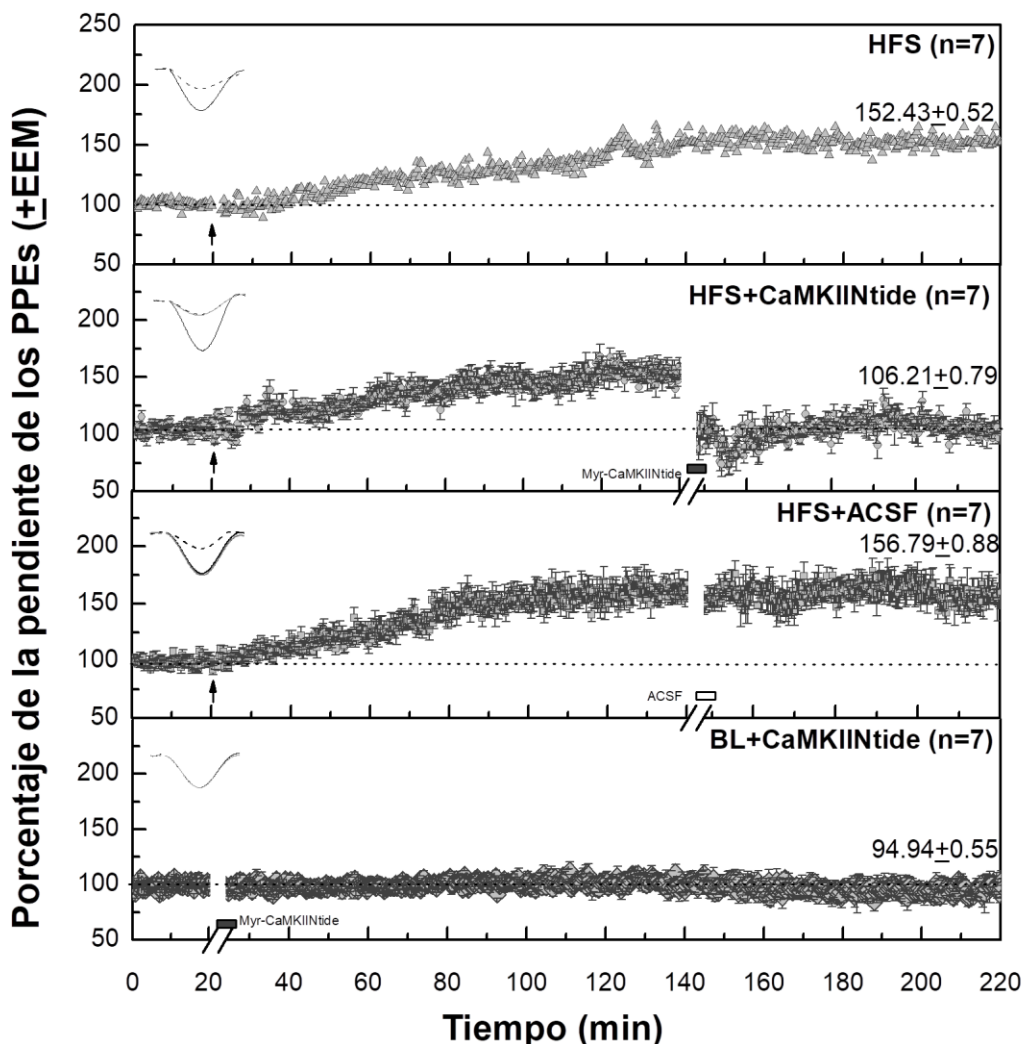


Figura 19. La inhibición de CaMKII revierte la LTP en la vía de las FM hipocámpales. Gráfica de la media de los porcentajes de los PPEs antes y después de la estimulación de alta frecuencia (flecha). Arriba de cada gráfica se muestra el trazo representativo de las señales obtenidas antes (línea sólida), 120 min después (línea punteada) de la estimulación de alta frecuencia y 60 min después de la microinfusión (línea gris).

El análisis de Western Blot mostró que la fosforilación de CaMKII fue disminuida por la administración de myr-CaMKIIntide. Como se observa en la Figura 20, la administración de myr-CaMKIIntide durante la fase de mantenimiento de la potenciación sináptica, decrementó la fosforilación de CaMKII en la región CA3 de los animales del grupo HFS+Ntide, comparada con los animales del grupo HFS+ACSF (prueba t no pareada; $t=7.6$; $p<0.001$). No se observaron cambios en la expresión total de CaMKI (Figura 20).

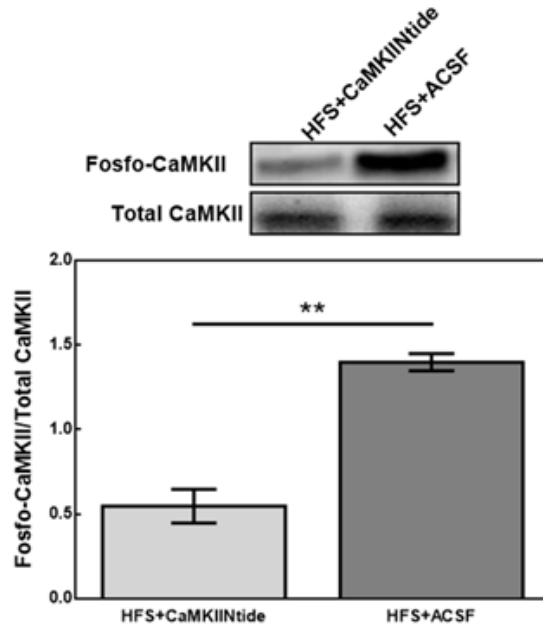


Figura 20. Western blots representativos y análisis densitométrico de la fosforilación de CaMKII en la región CA3 del hipocampo.

6.1.2. La inhibición de CaMKII previene la reorganización morfológica que acompaña a la potenciación inducida por HFS en las FM

Los análisis morfológicos mostraron que los animales control intactos (CON) presentaron botones FM exclusivamente en el SL del área CA3 hipocámpal (Figura 21). La estimulación de alta frecuencia en la vía FM-CA3 produjo un incremento bilateral de botones de las FM, con un incremento prominentemente contralateral visualizado mediante la densidad teñida mediante la técnica de Timm en la banda infrapiramidal de la región CA3 (SOSP). Siete días después de la inducción de la LTP, los gránulos teñidos mediante el Timm fueron observados en la región SPSO de los grupos HFS y HFS+ACSF (Figura 21). Este incremento no se observó cuando se administró myr-CaMKIIntide 2 h después de la estimulación de alta frecuencia (grupo HFS+Ntide). El ANOVA para el promedio del área positiva para Timm, obtenida mediante el análisis densitométrico cuantitativo del área SOSP para cada animal, reveló

diferencias significativas entre los grupos ($F_{4, 20} = 15.35$, $P < 0.001$). El análisis post-hoc con la prueba de Fisher reveló que el grupo HFS+Ntide mostró un área significativamente menor de gránulos teñidos ($P < 0.001$) comparado con los grupos HFS y HFS+ACSF. No se encontraron diferencias entre los grupos CON y BL+Ntide. Se obtuvieron resultados similares de la medición realizada con la gradilla de conteo, donde el ANOVA también reveló diferencias significativas entre los grupos ($F_{4, 20} = 50.29$; $P < 0.001$).

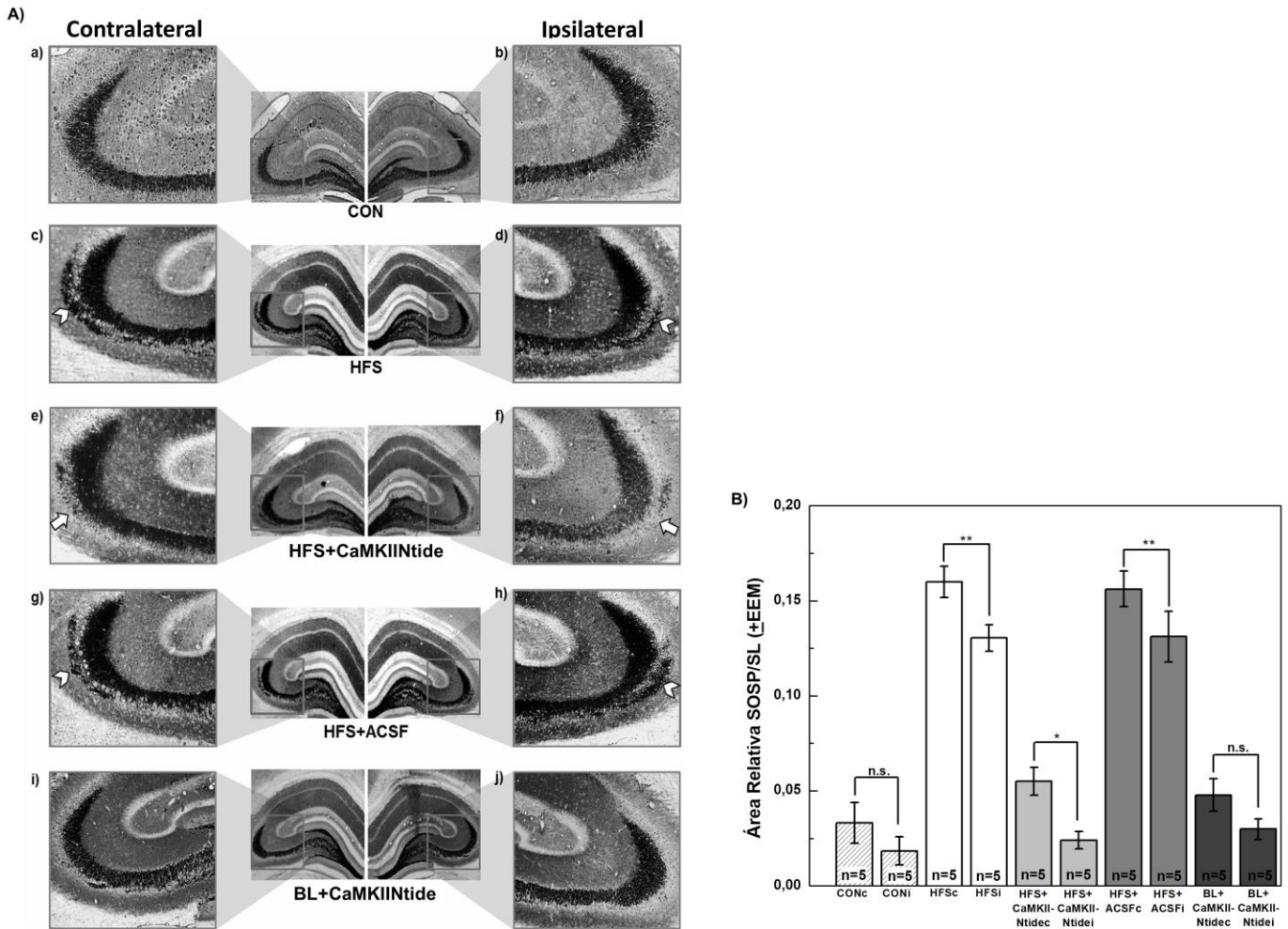


Figura 21. Efecto de la inhibición aguda de CaMKII sobre la reorganización sináptica de las fibras musgosas. A) Secciones coronales del hipocampo dorsal de los grupos intacto (CON, a y b), HFS (c y d), HFS+CaMKII Ntide (e y f), HFS+ACSF (g y h) y BL+CaMKII Ntide (i, j), se observa la reorganización sináptica (flechas) mediante la tinción de Timm. B) Gráfica que muestra el análisis densitométrico del área relativa de tinción. c, contralateral; i, ipsilateral. ** $p < .001$.

6.2. CaMKII en el mantenimiento de la plasticidad sináptica de la vía Bla-CI

6.2.1. Fase A: La inhibición de la fosforilación de CaMKII revierte la LTP en la vía Bla-CI en ratas adultas *in vivo*

El análisis histológico confirmó la correcta colocación de los electrodos, las ratas en las que tal criterio no se cumplió fueron excluidas de los análisis subsecuentes.

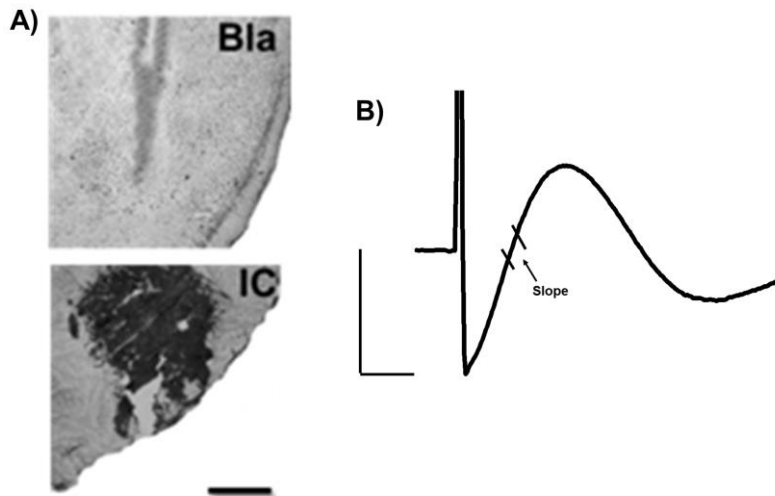


Figura 22. A) Imágenes representativas de la colocación de los electrodos que muestran los sitios de estimulación y de registro e infusión en un plano coronal. La microfotografía de la corteza insular muestra el área de difusión de CaMKIIIntide mediante la combinación del inhibidor con rojo de Ponceau. Bla: núcleo basolateral de la amígdala, IC: Corteza insular. Escala: 1mm. B) Trazo representativo de los PPEs obtenidos durante los registros. Se muestra el sitio de medición de la pendiente (slope). Escala: 5 ms, 0.5 mV.

La estimulación de alta frecuencia produjo un incremento en la pendiente de los PPEs de la CI. La aplicación de myr-CaMKIIIntide ($5\mu\text{g}/1\mu\text{l}$) en la CI (HFS+CaMKIIIntide group) bloqueó la fase de mantenimiento de la potenciación sináptica cuando el inhibidor fue aplicado 2 h después de la estimulación de alta frecuencia (figura 23), mientras que la infusión de ACSF ($1\mu\text{l}$, grupo HFS+ACSF) no tuvo efecto sobre la fase de mantenimiento de la LTP. De manera importante, no se observó ningún efecto cuando el inhibidor fue aplicado sin estimulación previa (grupo CaMKIIIntide).

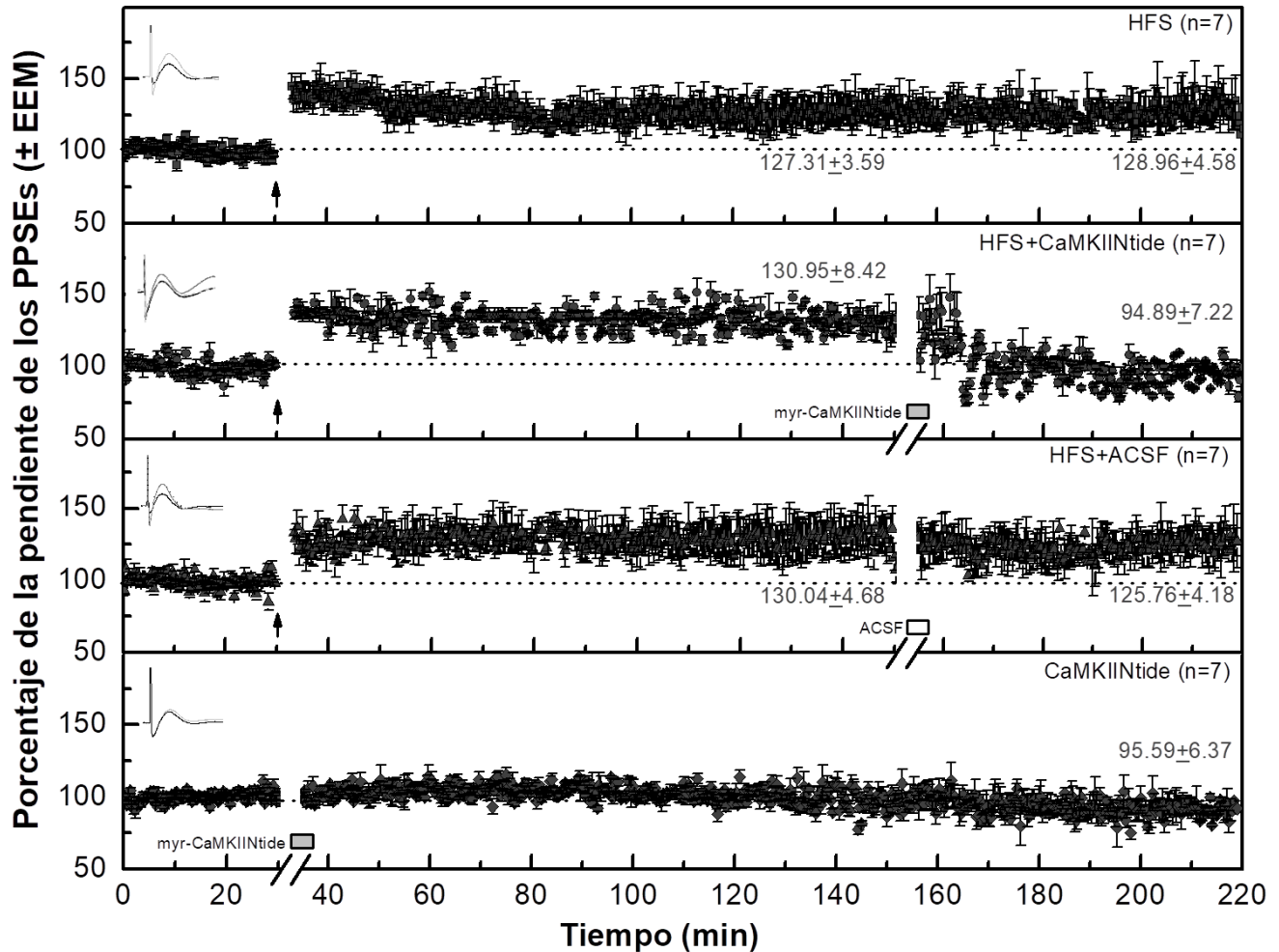


Figura 23. La inhibición de CaMKII revierte la LTP en la vía Bla-CI. A) Gráfica de la media de los porcentajes de los PPEs antes y después de la estimulación de alta frecuencia (flecha). Arriba de cada gráfica se muestra el trazo representativo de las señales obtenidas antes (línea sólida), 120 min después (línea punteada) de la estimulación de alta frecuencia y 60 min después de la microinfusión (línea dorada).

El análisis mediante Western Blot mostró que la fosforilación de CaMKII disminuyó por la administración de myr-CaMKIINtide. Como se observa en la Figura 24, la administración del inhibidor selectivo de CaMKII, myr-CaMKIINtide, durante la fase de mantenimiento de la potenciación sináptica, decrementó la fosforilación de CaMKII en la CI de los animales del grupo HFS+Ntide, comparada con los animales del grupo HFS+ACSF (prueba t no pareada; $t=7.6$; $p<0.001$). No se observaron cambios en la expresión total de CaMKII.

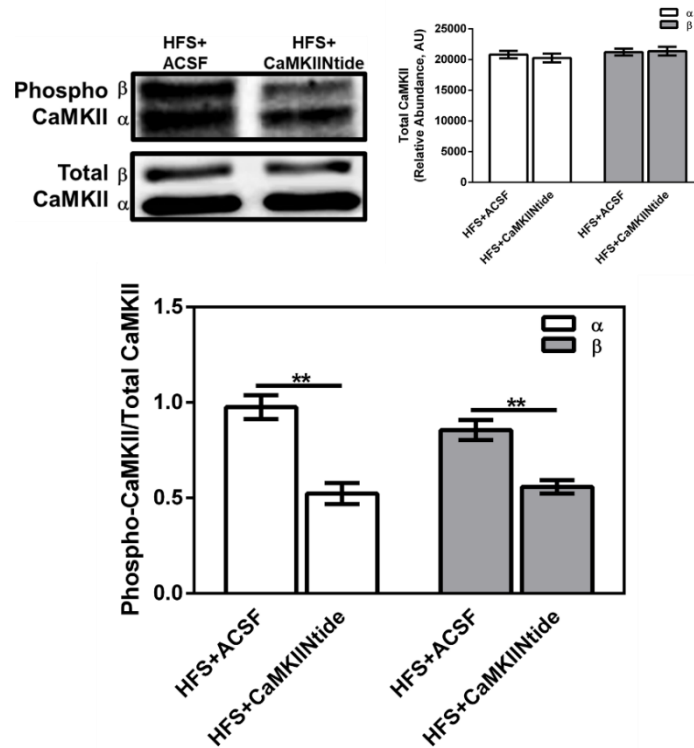


Figura 24. Western blots representativos y análisis densitométrico de la fosforilación de CaMKII en la corteza insular.

6.2.2. Fase B: La inhibición de CaMKII impide el mantenimiento de la MLP del CAS

Las ratas en las que el análisis histológico no confirmó la correcta colocación de las cánulas fueron excluidas de los análisis conductuales (Figura 25).

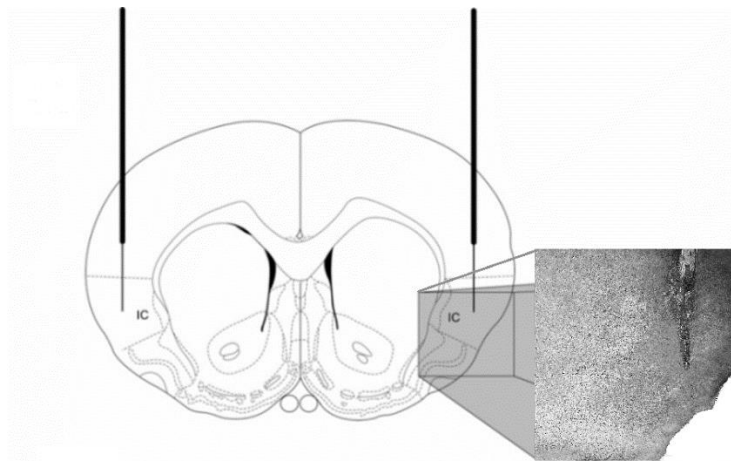


Figura 25. Representación esquemática e imagen representativa de la colocación de la cánula, así como la posición del microinyector en un plano coronal. IC: Corteza insular.

Los resultados muestran que la inhibición de CaMKII 24 h después de la sesión de adquisición es capaz de interferir con la memoria del CAS previamente establecida (Figura 25). De esta manera, no se observaron diferencias significativas entre los grupos (CAS+MCP+VEH, CAS+MCP+CaMKIIntide, CAS+CaMKIIntide y pseudoCAS+MCP+CaMKIIntide) en el consumo de sacarina durante la sesión de adquisición. El ANOVA factorial reveló que durante la prueba de memoria de corto plazo (MCP) los grupos CAS+MCP+VEH y CAS+MCP+CaMKIIntide redujeron significativamente el consumo de sacarina comparado con el correspondiente a la sesión de adquisición ($F_{1, 18} = 424.1$). Durante la prueba de aversión, efectuada 48 h después de la microinfusión ($F_{2, 26} = 22.26$), los grupos entrenados e infundidos con el inhibidor (CAS+MCP+CaMKIIntide, CAS+CaMKIIntide) mostraron diferencias significativas en el consumo de sacarina con respecto al grupo CAS+MCP+ACSF ($p < 0.001$), pero no entre sí.

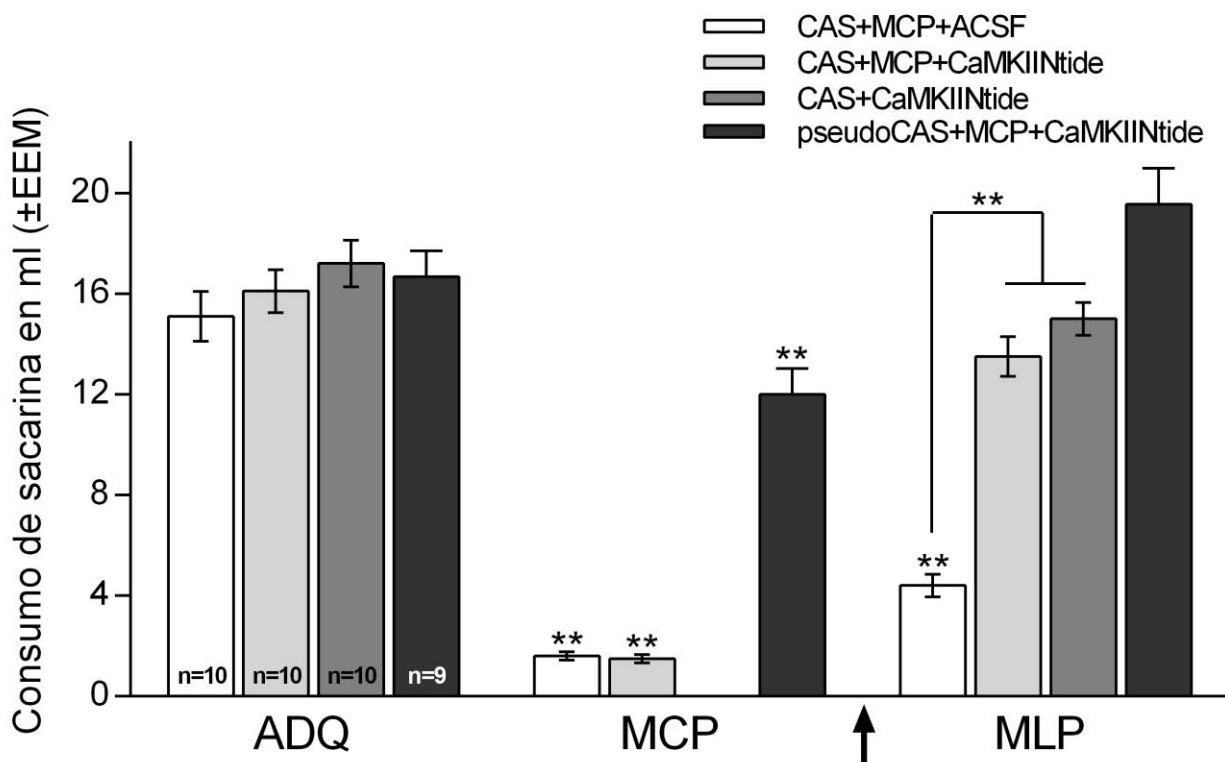


Figura 26. Efecto de la inhibición de CaMKII (24 h) sobre la memoria del CAS. Se muestra el consumo de sacarina en mililitros (media \pm error estándar de la media), durante la sesión de adquisición (ADQ), la prueba de memoria de corto plazo (MCP) y la prueba de aversión (MLP), la flecha indica la microinfusión. Se observa que los grupos CAS+MCP+CaMKIIntide y CAS+CaMKIIntide a los que se les administró el inhibidor de CaMKII veinticuatro horas después de la sesión de adquisición muestran un deterioro en el mantenimiento de la memoria del CAS, $** = p < 0.001$, $* = p < 0.01$.

7. Discusión

7.1. CaMKII es necesaria para el mantenimiento de la plasticidad sináptica funcional y estructural en la vía FM-CA3

Los cambios en la eficiencia sináptica que conducen al fortalecimiento de las sinapsis se han propuesto como el sustrato molecular del aprendizaje y la memoria. Los resultados presentados aquí muestran que CaMKII es necesaria para el mantenimiento de la potenciación de la transmisión sináptica en la vía FM-CA3 inducida por HFS *in vivo*, considerada como un importante circuito excitatorio implicado en la adquisición y almacenamiento de diferentes tareas de aprendizaje. La aplicación del inhibidor no competitivo de CaMKII, myr-CaMKIINtide, bloqueó la fase de mantenimiento de la potenciación sináptica. Esta supresión puede atribuirse a la disminución de la fosforilación de CaMKII, como se confirmó mediante el análisis de inmunotransferencia. Los estudios acerca del papel de CaMKII en el mantenimiento de la LTP son escasos, en este sentido Sanhueza y cols, reportaron que la aplicación de un inhibidor de CaMKII conlleva a la disminución de la potenciación sináptica durante la fase de mantenimiento de la LTP dependiente de receptores NMDA en el área CA1 del hipocampo *in vitro* (Sanhueza et al., 2007, Sanhueza et al., 2011). Si bien la interacción de CaMKII con los receptores de NMDA ha sido bien establecida, se conoce que CaMKII también interactúa y fosforila a un gran número de proteínas sinápticas (Mao et al., 2014).

La vía FM-CA3 exhibe una forma de LTP que es independiente de la activación de los receptores NMDA (Derrick et al., 2005). De hecho, algunas evidencias apuntan a la contribución exclusiva de los mecanismos presinápticos, incluyendo el aumento de las corrientes de calcio presinápticas y la activación de la cascada adenilato ciclasa-cAMP (Weisskopf et al., 1994; Zalutsky y Nicoll, 1990). En este sentido, se ha reportado que la aplicación presináptica de un inhibidor de CaMKII bloquea la LTP en cultivo de neuronas del hipocampo (Ninan y Arancio, 2004). En concordancia con lo anterior, se ha demostrado que CaMKII regula presinápticamente la dinámica de las vesículas, así como, la liberación de neurotransmisores, neuropéptidos y neurotrofinas (Carrillo et al., 2010, Shakiryanova et al., 2007). También hay datos que sugieren que la activación de los receptores de kainato presinápticos (KARs) y la liberación de calcio de las pozas intracelulares son parte de los mecanismos que subyacen a la LTP de la

vía de las FM (Bortolotto et al., 2003). Así, se ha demostrado que la estimulación repetida coincidente pre y postsináptica en las sinapsis de las FM hipocampales induce plasticidad sináptica de las respuestas mediadas por KARs y que CaMKII regula esta modificación a través de la fosforilación directa de KARs (Carta et al., 2013).

De forma alternativa, varios estudios apuntan a la importancia de la señalización de calcio postsináptico asociada con canales de calcio activados por voltaje y receptores metabotrópicos de glutamato en la LTP de las FM (Kapur et al., 1998; Kapur et al., 2001). En esta línea de ideas, se ha demostrado que la inhibición de la sinaptogénesis generada por la estimulación con K⁺ en las fibras musgosas depende de la modulación de CaMKII de los canales de Ca²⁺ de tipo L (Ikegaya et al., 2000). De forma similar, se ha descrito que CaMKII activa cascadas metabólicas que liberan calcio de las pozas intracelulares, de hecho, se ha demostrado que la activación de PKC conduce a un aumento en la expresión postsináptica de CaMKII autofosforilada y que ambas cinasas activan a los receptores inositol-1,4, 5-trisfosfato y de rianodina a través de su fosforilación directa (Yan et al., 2011).

Por otro lado, estudios previos de nuestro laboratorio muestran que el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) es altamente relevante en la regulación de la LTP de la vía FM-CA3 (Gómez-Palacio y Escobar, 2008; Schjetnan y Escobar, 2012). A este respecto, se ha demostrado que la infusión de BDNF recombinante a una dosis que facilita la retención de MLP también aumenta la autofosforilación de CaMKII en la corteza parietal (Alonso et al., 2005). Del mismo modo, en el hipocampo se ha demostrado que una vez activado por BDNF, CaMKII a su vez activa la subfamilia p38 de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) y su proteína efectora activada por MAP 2 (MAPKAPK 2) provocando la fosforilación de CREB nuclear en el residuo de serina 133, un sitio de regulación positivo (Blanquet, Mariani y Derer, 2003).

Hoy en día se considera que la reorganización morfológica producida por la actividad constituye un elemento importante en la estabilización de la plasticidad sináptica (Lynch et al., 2007). Los presentes hallazgos revelan que la inhibición de CaMKII durante la fase de mantenimiento de la LTP de la vía FM-CA3, bloquea la reorganización estructural de las fibras musgosas del hipocampo en el estrato oriens y piramidal del área CA3 que acompaña a la plasticidad sináptica generada por la aplicación de alta frecuencia. En este sentido, se ha descrito que el aumento de la actividad sináptica produce una

translocación de CaMKII desde el citoplasma hacia la densidad postsináptica (Bayer et al., 2006; Otmakhov et al., 2004; Tao-Cheng et al., 2006), donde contribuye a la reorganización sináptica (Fink et al., 2003). En cultivo de neuronas granulares del cerebelo CaMKII facilita el crecimiento dendrítico dependiente de la actividad (Gaudilliere et al., 2004). En este orden de ideas, se ha reportado que en cultivos organotípicos de rebanadas de hipocampo, la inyección intracelular de una forma activada de CaMKII es capaz de inducir LTP, así como la formación de nuevas espinas dendríticas y crecimiento filopodial, mientras que la administración de inhibidores de CaMKII bloquean los cambios morfológicos producidos por la inducción de LTP (Jourdain et al., 2003). Además, recientemente se mostró que los ratones *knock-out* heterocigotos para CaMKII exhiben desorganización de las fibras musgosas invadiendo regiones que normalmente no están inervadas por estas fibras (Nakahara, Miyake, Tajinda y Ito, 2015). Con relación a esto, varios estudios han demostrado la interacción de CaMKII con la polimerización de actina (Kim et al., 2015), así como con enzimas de la familia Rho / Rac que controlan la dinámica y la morfología de las espinas dendríticas (Murakoshi et al., 2011).

7.2. CaMKII es necesaria para el mantenimiento de la plasticidad sináptica en la vía Bla-CI y para la persistencia de la memoria del CAS

Se sabe que el daño al hipocampo genera una amnesia severa de la información adquirida recientemente, sin afectar la información remota. A la inversa, la atrofia neocortical conlleva alteraciones de la memoria remota (Squire et al., 2015; Tonegawa et al., 2018). En la actualidad se reconoce que la interacción entre ambas áreas es crucial para la formación y mantenimiento del trazo de memoria (Tonegawa et al., 2018).

Los resultados del presente estudio muestran que CaMKII también es necesaria para el mantenimiento de la potenciación de largo plazo en la neocorteza; particularmente en la vía Bla-CI, considerada como un importante circuito excitatorio implicado en la adquisición y almacenamiento de la memoria del CAS.

La administración intracortical de un inhibidor selectivo de CaMKII, myr-CaMKIINtide, dos horas después de la aplicación de estimulación de alta frecuencia suprimió la fase de mantenimiento de la potenciación sináptica; dicha supresión se puede atribuir principalmente al decremento en la

fosforilación de CaMKII, como se confirmó mediante el análisis de inmunotransferencia. Notablemente, la aplicación del inhibidor en ausencia de la estimulación de alta frecuencia no tuvo efecto sobre la transmisión basal. Como se expuso previamente, una gran cantidad de estudios han demostrado el papel potencial de CaMKII en el mantenimiento de la memoria, sin embargo, la mayoría de dichos hallazgos han sido reportados en el hipocampo. En este sentido, existe poca información acerca del papel de CaMKII en la LTP cortical. En un estudio en el que se generaron ratones *knock-out* heterocigotos para α CaMKII se observó que la LTP de cortezas visuales y temporales era deficiente comparada con la de animales silvestres (Frankland et al., 2001). En otro estudio, se mostró que una mutación que sustituye el residuo T286 por alanina (lo cual impide la autofosforilación de la cinasa), genera deficiencias en la LTP de la corteza somatosensorial (Hardingham et al., 2003).

En cuanto a los mecanismos moleculares, se ha descrito que la fosforilación de CaMKII propicia la actividad autónoma de la cinasa, así como su translocación a la postsinapsis donde interactúa con distintas proteínas blanco, como los receptores AMPA y NMDA (Baucum et al., 2015; Strack y Colbran, 1998). Se ha reportado que la ausencia de autofosforilación de CaMKII bloquea la LTP dependiente de NMDA en el hipocampo (Giese et al., 1998; Yamagata et al., 2009). Además, se ha establecido que CaMKII en su estado autónomo es capaz de fosforilar a los receptores AMPA, evento esencial en la inducción de LTP (Derkach et al., 1999; Ghosh et al., 2015). Por otro lado, se ha propuesto que la asociación de CaMKII con las subunidades GluN2B de los receptores NMDA es un mecanismo central durante el mantenimiento de la LTP en el hipocampo (Sanhueza et al., 2011). La formación del complejo CaMKII-NR2B persiste incluso después del término de la estimulación capaz de inducir LTP y esta asociación deja a la cinasa en una conformación parcialmente autónoma que media su redistribución (Bayer et al., 2006; O'Leary et al., 2011; Strack et al., 2000). La acumulación de CaMKII-NR2B en la densidad postsináptica promueve la captura de múltiples proteínas incluyendo actinina, densina, delta-catenina y N-caderina, la asociación de estas proteínas funciona como un andamio estructural que propicia una serie de reacciones que, en conjunto, contribuyen al mantenimiento de la LTP (Sanhueza et al., 2013).

Está bien establecido que la vía Bla-Cl contribuye a la formación y retención de la memoria del CAS (Escobar y Bermúdez, 2000; Rivera-Olvera et al., 2016; Rivera-Olvera et al., 2018; Rodríguez-Durán et al.,

2011; Rodríguez-Durán y Escobar, 2014; Rodríguez-Durán et al., 2017). El CAS y la LTP en la vía Bla-CI comparten mecanismos moleculares similares, como la dependencia de la activación de receptores NMDA (Escobar et al., 1998a, 2002; Rodríguez-Durán y Escobar, 2014), la activación de la cinasa regulada por la señal extracelular 1/2 (ERK1 / 2), la expresión de genes tempranos (Jones et al., 1999) y la dependencia de síntesis de proteínas (Moguel-González et al., 2008; Rodríguez-Durán et al., 2011). Sin embargo, la identidad de los actores involucrados en el mantenimiento de la MLP del CAS sigue siendo en gran parte desconocida. Los hallazgos reportados en este trabajo revelan que CaMKII es un actor relevante en el mantenimiento de la MLP del CAS, ya que la microinfusión intracortical de myr-CaMKIINtide 24 h después de la adquisición del CAS provocó un deterioro de la memoria durante la prueba de aversión, realizada 72 h después de la adquisición de CAS. Es importante destacar que el efecto de la inhibición de CaMKII en la MLP del CAS fue específico para la asociación EC-EI, ya que el déficit de memoria no se observó cuando las ratas fueron pseudoentrenadas en el CAS.

Se ha demostrado que el entrenamiento de ratas en el laberinto acuático de Morris correlaciona positivamente con un aumento en la actividad autónoma de CaMKII en el hipocampo (Tan y Liang, 1996). Además, el aprendizaje de una tarea de evitación inhibitoria incrementa la actividad de CaMKII en la formación hipocampal (Cammarota et al., 1998). Recientemente, se ha encontrado que la expresión transitoria de una forma dominante negativa de CaMKII conduce a una fuerte reducción de la memoria espacial de ratones que persiste aún después del cese de expresión de esta forma de CaMKII (Rosetti et al., 2017). En el caso de la CI, se ha demostrado que la exposición a un nuevo sabor conduce a un aumento en la autofosforilación de CaMKII hasta por 3 h después del consumo de sabor. Además, la aplicación de un inhibidor selectivo de CaMKII en la CI 25 min después del consumo de sacarina atenúa la memoria del CAS durante la prueba de aversión llevada a cabo 3 y 5 h después del establecimiento (Adaikkan y Rosenblum, 2015). Por otro lado, los estudios que apuntan a la alteración genética de la actividad de CaMKII han demostrado que los ratones mutantes homocigotos para la subunidad α de CaMKII presentan graves deficiencias en el aprendizaje espacial (Silva et al., 1992). Esta compensación no se puede encontrar en ratones con una mutación puntual del residuo T286 por alanina que impide la autofosforilación de la cinasa (Giese et al., 1998). Aunado a lo anterior, los ratones con una mutación para la autofosforilación de CaMKII exhiben alteración de la transcripción genética *de novo* requerida para la consolidación de la memoria de miedo contextual (von Herten y Giese, 2005).

En un estudio pionero Frankland y cols., demostraron que mientras que los ratones heterocigotos para una mutación nula de CaMKII presentan una retención de memoria normal para tareas contextuales de miedo y laberinto acuático entre 1 y 3 días después del entrenamiento, estos animales mostraron una fuerte amnesia cuando se evaluaron entre 10 y 50 días después de éste, lo cual sugiere un papel para CaMKII no solo en la consolidación sino también en el mantenimiento de la memoria (Frankland et al., 2001). Debido a que la asociación entre CaMKII y GluN2B se ha propuesto como un sustrato relevante para el mantenimiento de la memoria, los ratones con una mutación que impide la formación del complejo CaMKII-GluN2B muestran deterioro de la memoria en el laberinto acuático de Morris cuando se prueban 1 o 3 días después de la última sesión de entrenamiento (Halt et al., 2012).

La investigación en torno al proceso de consolidación de sistemas (proceso por el cual las memorias, inicialmente dependientes de áreas paleocorticales son reorganizadas en regiones neocorticales con el paso del tiempo), ha experimentado en los últimos años un progreso significativo. Derivado de este, hoy en día resulta cada vez más clara la interacción entre diversas áreas cerebrales que contribuyen al procesamiento de la memoria. En este contexto se enmarca el presente proyecto en el que exploramos la participación de la cinasa CaMKII en el mantenimiento de la información por periodos prolongados tanto en la vía de las fibras musgosas hipocampales como en la vía Bla-CI. Los hallazgos del presente estudio evidencian que esta molécula juega un papel decisivo en el mantenimiento de la plasticidad sináptica y la persistencia de la memoria tanto en áreas paleo como neocorticales.

8. Conclusiones

Los resultados del presente estudio muestran que:

- La infusión del inhibidor selectivo de CaMKII, myr-CaMKIINtide, en el área CA3 del hipocampo bloquea la fase de mantenimiento de la LTP en la vía de las fibras musgosas.
- La inhibición de la fosforilación de CaMKII previene la reorganización morfológica dependiente de actividad en el área CA3 del hipocampo.
- La inhibición de la fosforilación de CaMKII, bloquea la fase de mantenimiento de la LTP en la vía que va del núcleo basolateral de la amígdala a la corteza insular.
- La administración del inhibidor selectivo de CaMKII (myr-CaMKIINtide) veinticuatro horas después de la adquisición del CAS, bloquea la persistencia de la memoria de esta tarea.

En conjunto, estos hallazgos apoyan la idea de que CaMKII es un sustrato molecular clave en el mantenimiento a largo plazo de la plasticidad sináptica que subyace a la persistencia de la memoria.

9. Referencias

- Abraham, W.C. y Hugett, A. (1997). Induction and reversal of long-term potentiation by repeated high-frequency stimulation in rat hippocampal slices. *Hippocampus*. 7, 137-145.
- Abraham, W.C., Logan, B.B., Greenwood, J.M. y Dragunow, M. (2002). Induction and experience-dependent consolidation of stable long-term potentiation lasting months in the hippocampus. *J Neurosci*. 22 (21), 9626-34.
- Abraham, W. (2008). Metaplasticity: tuning synapses and networks for plasticity. *Nat Rev Neurosci*. 9 (5), 387.
- Acsády, L., Kamondi, A., Sik, A., Freund, T., y Buzsáki, G. (1998). GABAergic cells are the major post synaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *J Neurosci*. 18, 3386–3403.
- Adaikkan, C., y Rosenblum, K. (2015). A molecular mechanism underlying gustatory memory trace for an association in the insular cortex. *Elife*. 4, e07582.
- Alberini, C., y LeDoux, J. (2013). Memory reconsolidation. *Curr Biol*. 23(17), R746-R750.
- Andersen, P. (2007). *The hippocampus book*. New York, NY, USA: Oxford University Press.
- Appleby, V.J., Corrêa, S.A., Duckworth, J.K., Nash, J.E., Noël, J., Fitzjohn, S.M., Collingridge, G.L. y Molnár, E. (2011). LTP in hippocampal neurons is associated with a CaMKII-mediated increase in GluA surface expression. *Neurochem*. 116 (4), 530-543.
- Artola, A., y Singer, W. (1990). The involvement of N-methyl-D-aspartate receptors of induction and maintenance of long-term potentiation in rat visual cortex. *Eur J Neurosci*. 2, 254-269.
- Baltaci, S.B., Moğulkoç, R. y Baltaci, A.K. (2018). Molecular Mechanisms of Early and Late LTP. *Neurochemi Res*. 44, 281-296.
- Barria, A. y Manilow, R (2005). NMDA receptor subunit composition controls synaptic plasticity by regulating binding to CaMKII. *Neuron*. 48, 289-301.
- Baucum, A.J. 2nd, Shonesy, B.C., Rose, K.L. y Colbran, R.J. (2015). Quantitative proteomics analysis of CaMKII phosphorylation and the CaMKII interactome in the mouse forebrain. *ACS Chem Neurosci*. 6 (4), 615-631.
- Bayer, K.U., LeBel, E., McDonald, G.L., O'Leary, H., Schulman, H. y De Koninck, P. (2006). Transition from reversible to persistent binding of CaMKII to postsynaptic sites and NR2B. *J Neurosci*. 26 (4), 1164–1174.

- Bayer, K.U., De Koninck, P., Leonard, A.S., Hell, J.W. y Schulman, H. (2001). Interaction with the NMDA receptor locks CaMKII in an active conformation. *Nature*. 411 (6839), 801-805.
- Bear, M.F. y Kirkwood, A. (1993). Neocortical Long-term potentiation. *Curr Op Neurobiol*. 3, 197-202.
- Bear, M.F., Connors, B. y Paradiso, M. (2015). *Neuroscience: Exploring the Brain*. Baltimore, USA. Williams y Willkins. pp. 614.
- Bekinschtein, P., Katzev, C., Slipczuk, L.N., González, C.R., Dorman, G., Cammarota, M., Izquierdo, I.A. y Medina, J.H. (2010). Persistence of Long-Term Memory Storage: New Insights into its Molecular Signatures in the Hippocampus and Related Structures. *Neurotoxicity Res*. 18, 377-385.
- Bermúdez-Rattoni, F. (2004). Molecular mechanisms of taste recognition memory. *Nature Rev*. 5: 209-217.
- Bermúdez-Rattoni, F. (2014). The forgotten insular cortex. *Neurobiol Lear Mem*. 109, 207-216.
- Blanquet, P. R., Mariani, J. y Derer, P. (2003). A calcium/calmodulin kinase pathway connects brain-derived neurotrophic factor to the cyclic AMP-responsive transcription factor in the rat hippocampus. *J Neurosci*. 118 (2), 477-90.
- Bliss, T.V. y Lomo, T.V.P. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*. 232, 331-356.
- Bortolotto, Z.A., Lauri, S., Isaac, J.T. y Collingridge, G.L. (2003). Kainate receptors and the induction of mossy fibre long-term potentiation. *Philos Trans R Soc Lond Biol Sci*. 358, 657-666.
- Bozon, B.; Davis, S.; Laroche, S. (2003). "A requirement for the immediate early gene zif268 in reconsolidation of recognition memory after retrieval". *Neuron*. 40 (4): 695-701. doi:10.1016/s0896-6273(03)00674-3.
- Calabresi, P., Napolitano, M., Centonze, D., Marfia, G.A., Gubellini, P., Teuele, M.A., Berretta, N., Bernardi, G., Frati, L., Tolú, M. y Gulino, A. (2000). Tissue plasminogen activator controls multiple forms of synaptic plasticity and memory. *Eur J Neurosci*. 12, 1002-1012.
- Cammarota, M., Bernabeu, R., Levi De Stein, M., Izquierdo, I. y 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 (8), 2669-76.
- Caroni, P., Donato, F. y Muller, D. (2012). Structural plasticity upon learning: regulation and functions. *Nat Rev Neurosci*. 13, 478-490.
- Carrillo, R. A., Olsen, D. P., Yoon, K. S. y Keshishian, H. (2010). Presynaptic activity and CaMKII modulate retrograde semaphorin signaling and synaptic refinement. *Neuron*. 68, 32-44.

- Carta, M., Opazo, P., Veran, J., Athané, A., Choquet, D., Coussen, F. y Mulle, C. (2013). CaMKII-dependent phosphorylation of GluK5 mediates plasticity of kainate receptors. *EMBO J.* 32 (4), 496-510.
- Castillo, D.V. y Escobar, M.L. (2011). A role for MAPK and PI-3K signaling pathways in brain derived neurotrophic factor modification of conditioned taste aversion retention. *Behav Brain Res.* 217 (1), 248-252.
- Castillo, D.V.; Figueroa-Guzmán, Y. y Escobar, M.L. (2006). Brain derived neurotrophic factor enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Res.* 1067 (1), 250-255.
- Chang, B.H., Mukherji, S. y Soderling, T.R. (2001). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor protein: localization of isoforms in rat brain. *Neurosci.* 102, 767-777.
- Citri, A. y Malenka, R.C. (2008). Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacol.* 33, 18-41.
- Clugnet, M.C., LeDoux, J.E. y Morrison, S.F. (1990). Unit responses evoked in the amygdala and striatum by electrical stimulation of the medial geniculate body. *J Neurosci.* 10 (4), 1055-61.
- Coultrap, S. y Bayer, K. (2012). CaMKII regulation in information processing and storage. *Trends Neurosci.* 35 (10), 607-618.
- Cui, Z., Wang, H., Tan, Y., Zaia, K.A., Zhang, S. y Tsien, J.Z. (2004). Inducible and Reversible NR1 Knockout Reveals Crucial Role of the NMDA Receptor in Preserving Remote Memories in the Brain. *Neuron.* 41, 781-793.
- Derkach, V., Barria, A. y Soderling, T.R. (1999). Ca²⁺/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96 (6), 3269-74.
- Derrick, B.E., Weinberger, S.B. y Martinez, J.L Jr. (1991). Opioid receptors are involved in a NMDA receptor-independent mechanism of LTP induction at hippocampal Mossy Fiber-CA3 synapses. *Brain Res Bull.* 27, 219-233.
- Derrick, B.E., Rodriguez S.B., Lieberman, D.N. y Martinez, J.L. Jr. (1992). Mu opioid receptors are associated with the induction of hippocampal mossy fiber long-term potentiation. *J Pharmacol Exp Ther.* 263 (2), 725-33.
- Dudai, Y. y Eisenberg, M. (2004). Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron.* 44, 93-100.

- El Gaamouch, F., Buisson, A., Moustié, O., Lemieux, M., Labrecque, S., Bontempi, B., De Koninck, P. y Nicole, O. (2012). Interaction between α CaMKII and GluN2B controls ERK-dependent plasticity. *J Neurosci.* 32 (31), 10767-10779.
- Escobar, M.L., Alcocer I. y Bermúdez-Rattoni, F. (2002). In vivo effects of intracortical administration of NMDA and metabotropic glutamate receptors antagonists on neocortical long-term potentiation and conditioned taste aversion. *Behav Brain Res.* 129 (1-2), 101-6.
- Escobar, M.L., and Bermúdez-Rattoni, F. (2000). Long term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Res.* 852, 208-212.
- Escobar, M.L., Chao, V. y Bermúdez-Rattoni, F. (1998a). In vivo long-term potentiation in the insular cortex: NMDA receptor dependence. *Brain Res.* 779, 314-319.
- Escobar, M. L. y Derrick, B. (2007). Long-term potentiation and depression as putative mechanisms for memory formation. En: Bermúdez-Rattoni F, ed. Neural plasticity and memory: From genes to brain imaging. *Front Neurosci.*
- Escobar, M.L., Alcocer, I. y Chao, V. (1998b). The NMDA receptor antagonist CPP impairs conditioned taste aversion and insular cortex long term potentiation in vivo. *Brain Res.* 812, 246-251.
- Escobar, M.L., Barea-Rodríguez, E.J., Derrick, B.E., Reyes, J.A. y Martínez, J.L. Jr. (1997). Opioid receptor modulation of mossy fiber synaptogenesis: independence from long-term potentiation. *Brain Res.* 751 (2), 330-335.
- Evstratova, A. y Tóth, K. (2014). Information processing and synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber terminals. *Front Cell Neurosci.* 8, 28.
- Fernández-Espejo, E. (1996). [Basic neurobiology of hippocampal formation]. *Rev Neurol.* 24, 779-784.
- Ferreira, G., Gutiérrez, R., De la Cruz, V. y Bermúdez-Rattoni, F. (2002). Differential involvement of cortical muscarinic and NMDA receptors in short- and long-term taste aversion memory. *Eur J Neurosci.* 16, 1139-1145.
- Ferreira, G., Miranda, M.I., De la Cruz, V., Rodríguez-Ortiz, C.J. y Bermúdez-Rattoni, F. (2005). Basolateral amygdala glutamatergic activation enhances taste aversion through NMDA receptor activation in the insular cortex. *Eur J Neurosci.* 22 (10), 2956-2604.
- Fink, C.C., Bayer, K.U., Myers, J.W., Ferrell, J.E. Jr., Schulman, H. y Meyer, T. (2003). Selective regulation of neurite extension and synapse formation by the β but not the α isoform of CaMKII. *Neuron.* 39, 283-297.
- Frankland, P.W., O'Brien, C., Ohno, M., Kirkwood, A., y Silva, A.J. (2001). Alpha-CaMKII-dependent plasticity in the cortex is required for permanent memory. *Nature.* 411 (6835), 309-13.

- Frederickson, C.J., Klitenick, M.A., Manton, W.I. y Kirkpatrick, J.B. (1983). Cytoarchitectonic distribution of zinc in the hippocampus of man and the rat. *Brain Res.* 273, 335-339.
- Frederickson, C.J., Koh, J.Y. y Bush, A.I. (2005). The neurobiology of zinc in health and disease. *Nat Rev Neurosci.* 6, 449-462.
- Gale, G.D., Anagnostaras, S.G., Godsil, B.P., Mitchell, S.M., Nozawa, T., Sage, J.R., Wiltgen, B. y Fanselow, M.S. (2004). Role of the basolateral amygdala in the storage of fear memories across the adult lifetime of rats. *J Neurosci.* 24 (15), 3810-3815.
- García, J., Kimeldorf, D. y Koelling, R. (1955). Conditioned taste aversion to saccharine resulting from exposure to gamma radiation. *Science.* 122, 157-158.
- Gaudilliere, B., Konishi, Y., de la Iglesia, N., Yao, G. y Bonni, A. (2004). A CaMKII-NeuroD signaling pathway specifies dendritic morphogenesis. *Neuron.* 41, 229-241.
- Ghosh, S., Reuveni, I., Barkai, E., y Lamprecht R. (2015). CaMKII activity is required for maintaining learning-induced enhancement of AMPAR-mediated synaptic excitation. *J Neurochem.* 136 (6), 1168-1176.
- Giese, K.P., Fedorov, N.B., Filipkowski, R.K., y Silva, A.J. (1998). Autophosphorylation at Thr286 of the alpha calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning. *Science.* 279 (5352), 870-873.
- Giese, K.P. y Mizuno, K. (2013). The roles of protein kinases in learning and memory. *Learn Mem.* 20 (10), 540-552.
- Gomez-Monterrey, I., Sala, M., Rusciano, M.R., Monaco, S., Maione, A.S., Iaccarino, G., Tortorella, P., D'Ursi, A.M., Scrima, M., Carotenuto, A., De Rosa, G., Bertamino, A., Vernieri, E., Grieco, P., Novellino, E., Illario, M. y Campiglia, P. (2013). Characterization of a selective CaMKII peptide inhibitor. *Eur J Med Chem.* 62, 425-434.
- Gómez-Palacio-Schjetnan, A. y Escobar, M.L. (2008). In vivo BDNF modulation of adult functional and morphological synaptic plasticity at hippocampal mossy fibers. *Neurosci Lett.* 445 (1), 62-67.
- Halt, A.R., Dallapiazza, R.F., Zhou, Y., Steins, I.S., Qian, S.J., Wojcik, S., Brose, N., Silva, A.J. y Hell, J.W. (2012). CaMKII binding to GluN2b is critical during memory consolidation. *EMBO J.* 31, 1203-1216.
- Hardingham, N.R., Glazewski, S., Pakhotin, P., Mizuno, K., Chapman, P.F., Giese, K.P. y Fox, K. (2003). Neocortical long-term potentiation and experience-dependent synaptic plasticity require alpha-calcium/calmodulin-dependent protein kinase II autophosphorylation. *J Neurosci.* 23(11), 4428-4436.

- Harris, E.W. y Cotman, C. (1986). Long-term potentiation of guinea pig mossy fiber responses is not blocked by N-methyl D-aspartate antagonists. *Neurosci Lett.* 70 (1), 132-137.
- He, Y., Kulasiri, D. y Samarasinghe, S. (2015). Modelling the dynamics of CaMKII-NMDAR complex related to memory formation in synapses: the possible roles of threonine 286 autophosphorylation of CaMKII in long term potentiation. *J Theor Biol.* 365, 403-19.
- He, X., Yang, F., Xie, Z. y Lu, B. (2000). Intracellular Ca and Ca/calmodulin dependent kinase II mediate acute potentiation of neurotransmitter release by neurotrophin-3. *J Cell Biol.* 149, 783-792.
- Hebb, D. (1949). The organization of behavior. *Theor Biol.* 2, 204-35.
- Hell, J.W. (2014). CaMKII: Claiming Center Stage in Postsynaptic Function and Organization. *Neuron.* 81, 249-265.
- Ho, V.M., Lee, J.A. y Martin, K.C. (2011). The cell biology of synaptic plasticity. *Science.* 6056, 623-628.
- Huang, Y.Y., Li, X. y Kandel, E.R. (1994). cAMP contributes to mossy fiber LTP by initiating both a covalently mediated early phase and macromolecular synthesis-dependent late phase. *Cell.* 79, 69-79.
- Huang, Y.Y., Colino, A., Selig, D.K. y Malenka, R.C. (1992). The influence of prior synaptic activity on the induction of long-term potentiation. *Science.* 255, 730-733.
- Ikegaya, Y., Nishiyama, N. y Matsuki, N. (2000). L-type Ca(2+) channel blocker inhibits mossy fiber sprouting and cognitive deficits following pilocarpine seizures in immature mice. *Neurosci.* 98 (4), 647-59.
- Irvine E.E., von Herten, L.S., Plattner, F. y Giese, K.P. (2006). alphaCaMKII autophosphorylation: a fast track to memory. *Trends Neurosci.* 29 (8), 459-65.
- Jacobs, S., Cui, Z., Feng, R., Wang, H., Wang, D. y Tsien, J.Z. (2014). Molecular and genetic determinants of the NMDA receptor for superior learning and memory functions. *PLoS One.* 9 (10), e111865.
- Jinde, S., Zsiros, V., y Nakazawa, K. (2013). Hilar mossy cell circuitry controlling dentate granule cell excitability. *Front Neural Circuits.* 7, 14.
- Jones, M.W., French, P.J., Bliss, T.V. y Rosenblum, K. (1999). Molecular mechanism of long term potentiation in the insular cortex in vivo. *J Neurosci.* 123, 844-850.
- Jourdain, P., Fukunaga, K. y Muller, D. (2003). Calcium/calmodulin dependent protein kinase II contributes to activity-dependent filopodia growth and spine formation. *J Neurosci.* 23, 10645-10649.

- Kapur, A., Yeckel, M. y Johnston, D. (2001). Hippocampal mossy fiber activity evokes Ca²⁺ release in CA3 pyramidal neurons via a metabotropic glutamate receptor pathway. *Neurosci.* 107, 59-69.
- Kapur, A., Yeckel, M.F., Gray, R. y Johnston, D. (1998). L-Type calcium channels are required for one form of hippocampal mossy fiber LTP. *J Neurophysiol.* 79, 2181-2190.
- Katche, C, Cammarota, M y Medina, JH (2013). Molecular signatures and mechanisms of long lasting memory consolidation and storage. *Neurobiol Learn Mem.* 106:40-7.
- Kesner, R.P. (2013). A process analysis of the CA3 subregion of the hippocampus. *Front Cell Neurosci.* 7, 78.
- Kim, K., Lakhanpal, G., Lu, H.E., Khan, M., Suzuki, A., Hayashi, M.K., Narayanan, R., Luyben, T.T., Matsuda, T., Nagai, T., Blanpied, T.A., Hayashi, Y. y Okamoto, K. (2015). A Temporary Gating of Actin Remodeling during Synaptic Plasticity Consists of the Interplay between the Kinase and Structural Functions of CaMKII. *Neuron.* 87 (4), 813-826.
- Kitamura, T., Ogawa, S., Roy, D., Okuyama, T., Morrissey, M., Smith, L., Redondo, R. y Tonegawa, S. (2017). Engrams and circuits crucial for systems consolidation of a memory. *Science*, 356(6333), 73-78.
- Lamprecht, R. y LeDoux, J. (2004). Structural plasticity and memory. *Nat Rev Neurosci.* 5(1): 45-54.
- Lee, J. L.; Everitt, B. J.; Thomas, K. L. (2004). "Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation". *Science.* 304 (5672): 839–843. doi:10.1126/science.1095760.
- Lisman, J.E. (2017). Criteria for identifying the molecular basis of the engram (CaMKII, PKMzeta). *Mol Brain.* 10 (1), 55.
- Lisman, J.E. y Raghavachari, S. (2015). Biochemical principles underlying the stable maintenance of LTP by the CaMKII/NMDAR complex. *Brain Res.* 1621, 51-61.
- Lisman, J., Yasuda, R. y Raghavachari, S. (2012). Mechanisms of CaMKII action in long term potentiation. *Nat Rev Neurosci.* 13 (3), 169-182.
- Lisman, J., Schulman, H. y Cline, H. (2002). The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci.* 3 (3), 175-190.
- López-García, J.C, Arancio, O., Kandel, E.R. y Baranes, D. (1996). A presynaptic locus for long-term potentiation of elementary synaptic transmission at mossy fiber synapses in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 4712–4717.
- Losi, G., Prybylowski, K., Fu, Z., Lou, J.H., y Vicini, S. (2002). Silent synapses in developing cerebellar granule neurons. *J Neurophysiol.* 87, 1263-1270.

- Lynch, G., Rex, C. S. y Gall, C. M. (2007). LTP consolidation: substrates, explanatory power, and functional significance. *Neuropharmacology*. 52, 12-23.
- Lynch, MA (2004). Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev*. 84, 87-136.
- Malenka, R. (2003). The long-term potential of LTP. *Nat Rev Neurosci*. 4, 923-926.
- Malenka, R.C. y Bear, M.F. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron*. 44, 5–21.
- Mao, L.M., Jin, D.Z., Xue, B., Chu X.P. y Wang, J.Q. (2014). Phosphorylation and regulation of glutamate receptors by CaMKII. *Sheng Li Xue Bao*. 66 (3), 365-72.
- Matias, C.M., Dionisio, J.C., Saggau, P. y Quintana-Ferreira, M.A. (2014). Activation of group II metabotropic glutamate receptors blocks zinc release from hippocampal mossy fibers. *Biol Res*. 47 (1), 73.
- Mayadevi, M., Archana, G.M., Prabhu, R.R. y Omkumar, R.V. (2012). *Molecular Mechanisms in Synaptic Plasticity*. In Neuroscience - Dealing With Frontiers, C.M. Contreras, ed. (InTech).
- McKernan, M.G. y Shinnick-Gallagher, P. (1997). Fear conditioning induces a lasting potentiation of synaptic currents in vitro. *Nature*. 390, 607–611.
- Merlo, E., Bekinschtein, P., Jonkman, S. y Medina, J. (2015). Molecular Mechanisms of Memory Consolidation, Reconsolidation, and Persistence. *Neural Plast*.
- Miranda, M.I., LaLumière, R.T., Buen, T.V., Bermúdez-Rattoni, F. y McGaugh, J.L. (2003). *Eur J Neurosci*. 18 (9), 2605-2610.
- Moguel-González, M.G., Gómez-Palacio-Schjetnan, A. y Escobar, M.L. (2008). BDNF reserves the CTA memory deficits produced by inhibition of protein synthesis. *Neurobiol Learn Mem*. 90, 584-587.
- Murakoshi, H., Shin, M.E., Parra-Bueno, P., Szatmari, E.M., Shibata, A.C.E. y Yasuda, R. (2017) Kinetics of Endogenous CaMKII Required for Synaptic Plasticity Revealed by Optogenetic Kinase Inhibitor. *Neuron*. 94 (3), 690.
- Murakoshi, H., Wang, H. y Yasuda, R. (2011). Local, persistent activation of Rho GTPases during plasticity of single dendritic spines. *Nature*. 472 (7341), 100-104.
- Nader, K. y Einarsson, E.O. (2010). Memory reconsolidation: an update. *Ann N Y Acad Sci*. 1191, 27-41.
- Nakahara, S., Miyake, S., Tajinda, K. y Ito, H. (2015). Mossy fiber mis-pathfinding and semaphorin reduction in the hippocampus of α -CaMKII hKO mice. *Neurosci Lett*, 598, 47-51.

- Nakahata, Y. y Yasuda, R. (2018). Plasticity of Spine Structure: Local Signaling, Translation and Cytoskeletal Reorganization. *Front Synaptic Neurosci.* 10, 29.
- Nicoll, R.A. (2017). A Brief History of Long-Term Potentiation. *Neuron.* 93, 281-290.
- Nicoll, R. A. y Schmitz, D. (2005). Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nat Rev Neurosci.* 6, 863–876.
- Ninan, I. y Arancio, O. (2004). Presynaptic CaMKII is necessary for synaptic plasticity in cultured hippocampal neurons. *Neuron.* 42(1), 129-141.
- O'Leary, H., Liu, W.H., Rorabaugh, J.M., Coultrap, S.J., y Bayer, K.U. (2011). Nucleotides and phosphorylation bi-directionally modulate Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) binding to the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunit GluN2B. *J Biol Chem.* 286 (36), 31272-31281.
- Omkumar, R.V., Kiely, M.J., Rosenstein, A.J., Min, K.T. y Kennedy, M.B. (1996). Identification of a phosphorylation site for calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem.* 271 (49), 31670-8.
- Otmakhov, N., Tao-Cheng, J. H., Carpenter, S., Asrican, B., Dosemeci, A., Reese, T. S. y Lisman, J. (2004). Persistent accumulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in dendritic spines after induction of NMDA receptor-dependent chemical long-term potentiation. *Journal of Neuroscience,* 24, 9324–9331.
- Pan, Y., Chan, G.C., Kuo, C.T., Storm, D.R. y Xia, Z. (2012). Inhibition of adult neurogenesis by inducible and targeted deletion of ERK5 mitogen-activated protein kinase specifically in adult neurogenic regions impairs contextual fear extinction and remote fear memory. *J Neurosci.* 32 (19), 6444-55.
- Parfitt, G.M., Campos, R.C., Barbosa, Â.K., Koth, A.P. y Barros, D.M. (2012). Participation of hippocampal cholinergic system in memory persistence for inhibitory avoidance in rats. *Neurobiol Learn Mem.* 97, 183-188.
- Paxinos, G y Watson, C (2007). *The Rat Brain in stereotaxic coordinates.* Londres. Academic Press.
- Pereira, L.D., Castro, C.M., Guerra, L.T., Queiroz, T.M., Marques, J.T. y Pereira, G.S. (2018). Hippocampus and Prefrontal Cortex Modulation of Contextual Fear Memory Is Dissociated by Inhibiting De Novo Transcription During Late Consolidation. *Mol Neurobiol.* 1-13.
- Pignatelli, M., Ryan, T., Roy, D., Lovett, C., Smith, L., Muralidhar, S. y Tonegawa, S. (2019). Engram Cell Excitability State Determines the Efficacy of Memory Retrieval. *Neuron.* 101(2), 274-284.
- Ramírez-Amaya, V., Balderas, I., Sandoval, J., Escobar, M. L. y Bermudez-Rattoni, F. (2001). Spatial long-term memory is related to mossy fiber synaptogenesis. *J Neurosci.* 21, 7340–7348.

- Ramos-Languren, LE y Escobar, ML (2013). Plasticity and metaplasticity of adult rat hippocampal mossy fibers induced by neurotrophin-3. *Eur J Neurosci.* 37 (8), 1248-59.
- Rekart, J.L., Sandoval, C.J., Bermudez-Rattoni, F. y Routtenberg, A. (2007). Remodeling of hippocampal mossy fibers is selectively induced seven days after the acquisition of a spatial but not a cued reference memory task. *Learn Mem.* 14, 416–421.
- Riedel, G., Casabona, G., Platt, B., Macphail, E.M. y Nicoletti, F. (2000). Fear conditioning-induced time- and subregion-specific increase in expression of mGlu5 receptor protein in rat hippocampus. *Neuropharmacology.* 39, 1943-1951.
- Riout-Pedotti, M.S., Friedman, D., Hess, G. y Donoghue, J.P. (1998). Strengthening of horizontal cortical connections following skill learning. *Nat Neurosci.* 1, 230–234.
- Rivera-Olvera, A., Nelson-Mora, J., Gonsebatt, M.E. y Escobar, M.L. (2018). Extinction of aversive taste memory homeostatically prevents the maintenance of in vivo insular cortex LTP: Calcineurin participation. *Neurobiology of Learning and Memory.* 154, 54-61.
- Rivera-Olvera, A., Rodríguez-Durán, L.F. y Escobar, M.L. (2016). Conditioned taste aversion prevents the long-lasting BDNF-induced enhancement of synaptic transmission in the insular cortex: A metaplastic effect. *Neurobiology of Learning and Memory.* 130, 71-76.
- Rodríguez-Blanco, L.A., Rivera-Olvera, A. y Escobar, M.L. (2019). Consolidation of an aversive taste memory requires two rounds of transcriptional and epigenetic regulation in the insular cortex. *Behavioural Brain Research.* 356, 371-374.
- Rodríguez-Durán, L.F. y Escobar, M.L. (2014). NMDA receptor activation and PKC but not PKA lead to the modification of the long-term potentiation in the insular cortex induced by conditioned taste aversion: differential role of kinases in metaplasticity. *Behav Brain Res.* 266, 58-62.
- Rodríguez-Durán, L.F., Castillo, D.V., Moguel-González, M. y Escobar, M.L. (2011). Conditioned taste aversion modifies persistently the subsequent induction of neocortical long-term potentiation in vivo. *Neurobiol Learn Mem.* 95(4), 519-526.
- Rodríguez-Durán, L.F., Martínez-Moreno, A. y Escobar, M.L. (2017). Bidirectional modulation of taste aversion extinction by insular cortex LTP and LTD. *Neurobiol Learn Mem.* 142(Pt A), 85-90
- Rogan, M.T., Stäubli, U.V. y LeDoux, J.E. (1997). Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature.* 390, 604–607.
- Rossetti, T., Banerjee, S., Kim, C., Leubner, M., Lamar, C., Gupta, P., Lee, B., Neve, R. y Lisman, J. (2017) Memory Erasure Experiments Indicate a Critical Role of CaMKII in Memory Storage. *Neuron.* 96 (1), 207-216.

- Sanhueza, M., Fernández-Villalobos, G., Stein, I.S., Kasumova, G., Zhang, P., Bayer, K.U., Otmakhov, N., Hell, J.W. y Lisman, J. (2011). Role of the CaMKII/NMDAR complex in the maintenance of synaptic strength. *J Neurosci.* 31 (25), 9170-9178.
- Sanhueza, M., McIntyre, C.C. y Lisman, J.E. (2007). Reversal of Synaptic Memory by Ca/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Inhibitor. *J Neurosci.* 19, 5190-5199.
- Sanhueza, M. y Lisman, J. (2013). CaMKII/NMDAR complex as a molecular memory. *Mol Brain.* 6, 10.
- Schjetnan, A. G. y Escobar, M. L. (2012). In vivo BDNF modulation of hippocampal mossy fiber plasticity induced by high frequency stimulation. *Hippocampus.* 22(1), 1-8.
- Schmitt, J.M., Wayman, G.A., Nozaki, N. y Soderling, T.R. (2004). Calcium activation of ERK mediated by Calmodulin Kinase I. *J of Biol Chem.* 279 (23), 24064-24072.
- Shakiryanova, D., Klose, M.K., Zhou, Y., Gu, T., Deitcher, D.L., Atwood, H.L., Hewes, R.S. y Levitan, E.S. (2007). Presynaptic ryanodine receptor-activated calmodulin kinase II increases vesicle mobility and potentiates neuropeptide release. *Journal of Neuroscience.* 27 (29), 7799-806.
- Silva, A.J., Stevens, C.F., Tonegawa, S. y Wang, Y. (1992). Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science.* 5067, 201-206.
- Squire, L.R., Genzel, L., Wixted, J.T. y Morris, R.G. (2015). Memory consolidation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 7 (8), a021766.
- Strack, S. y Colbran, R.J. (1998). Autophosphorylation-dependent targeting of calcium/ calmodulin-dependent protein kinase II by the NR2B subunit of the N-methyl- D-aspartate receptor. *J Biol Chem.* 273 (33), 20689-92.
- Strack, S., McNeil, R.B. y Colbran, R.J. (2000). Autophosphorylation-dependent Targeting of Calcium / Calmodulin-dependent Protein Kinase II by the NR2B Subunit of the N-Methyl- D -aspartate Receptor. *J Biol Chem.* 275 (31), 23798-23806.
- Tsumoto, T. (1990). Long-term potentiation and depression in the cerebral neocortex. *Jpn J Physiol,* 40 (5), 573-93.
- Sutton, M.A., Masters, S.E., Bagnall, M.W. y Carew, T.J. (2001). Molecular Mechanisms Underlying a Unique Intermediate Phase of Memory in Aplysia. *Neuron.* 31, 143-154.
- Sweatt, J.D. (2016). Neural plasticity and behavior - sixty years of conceptual advances. *J Neurochem.* 139 Suppl 2, 179-199.

- Tan S.E. y Liang K.C. (1996). Spatial learning alters hippocampal calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity in rats. *Brain Res.* 711 (1-2), 234-40.
- Tao-Cheng, J.H., Dosemeci, A., Winters, C.A. y Reese, T.S. (2006). Changes in the distribution of calcium calmodulin dependent protein kinase II at the presynaptic bouton after depolarization. *Brain Cell Biol.* 35, 117–124.
- Taylor, C.J., Ohline, S.M., Moss, T.J., Ulrich, K. y Abraham, W.C. (2016). The persistence of long-term potentiation in the projection from ventral hippocampus to medial prefrontal cortex in awake rats. *Eur J Neurosci.* 43 6, 811-822.
- Terman, G.W., Drake, C.T., Simmons, M.L., Milner, T.A. y Chavkin, C. (2000). Opioid modulation of recurrent excitation in the hippocampal dentate gyrus. *J Neurosci.* 20 (12), 4379-4388.
- Tonegawa, S., Morrissey, M.D. y Kitamura, T. (2018). The role of engram cells in the systems consolidation of memory. *Nat Rev Neurosci.* 19, 485-498.
- Tronson, N. y Taylor, J. (2007). Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nat Rev Neurosci,* 8(4), 262-275.
- van Strien, N.M., Cappaert, N.L. y Witter, M.P. (2009). The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal–hippocampal network. *Nat Rev Neurosci.* 10, 272-282.
- von Herten, L.S. y Giese, K.P. (2005). Alpha-isoform of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II autophosphorylation is required for memory consolidation-specific transcription. *Neuroreport.* 16 (12), 1411-4.
- Wang, J.H. y Stelzer, A. (1996). Shared calcium signaling pathways in the induction of long-term potentiation and synaptic desinhibition in CA1 pyramidal cell dendrite. *J Neurophysiol.* 75, 1687-1702.
- Wang, X., Li, M., Zhu, H.S., Yu, Y., Xu, Y., Zhang, W. y Bian, C. (2018). Transcriptional Regulation Involved in Fear Memory Reconsolidation. *J Mol Neurosci.* 65, 127-140.
- Weisskopf, M.G., Castillo, P.E., Zalutsky, R.A. y Nicoll, R.A. (1994). Mediation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by cyclic AMP. *Science.* 265, 1878–1882.
- Whitlock, J.R., Heynen, A.J., Shuler, M.G., y Bear, M.F. (2006). Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science.* 313 (5790), 1093-7.
- Yamagata, Y., Kobayashi, S., Umeda, T., Inoue, A., Sakagami, H., Fukaya, M., Watanabe, M., Hatanaka, N., Totsuka, M., Yagi, T., Obata, K., Imoto, K., Yanagawa, Y., Manabe, T. y Okabe, S. (2009) Kinase-dead knock-in mouse reveals an essential role of kinase activity of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein

kinase II alpha in dendritic spine enlargement, long-term potentiation, and learning. *J Neurosci.* 29 (23), 7607-18.

Wiera, G. y Mozrzymas, J.W. (2015). Extracellular proteolysis in structural and functional plasticity of mossy fiber synapses in hippocampus. *Front Cell Neurosci.* 9 (427), 1-21.

Wieczorek, L., Maas, J.W., Muglia, L.M., Vogt, S.K. y Muglia, L.J. (2010). Temporal and Regional Regulation of Gene Expression by Calcium-Stimulated Adenylyl Cyclase Activity during Fear Memory. *PLoS one.* 5 (10), e13385.

Wiltgen, B.J. y Tanaka, K.Z. (2013). Systems consolidation and the content of memory. *Neurobiology of Learn Mem.* 106, 365-371.

Witter, M.P. y Amaral, D.G. (2004). *Hippocampal Formation.* The Rat Nervous System (3a ed). Academic Press. 635-704.

Yan, J. Z., Xu, Z., Ren, S. Q., Hu, B., Yao, W., Wang, S. H., Liu, S. Y. y Lu, W. (2011). Protein kinase C promotes N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor trafficking by indirectly triggering calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) autophosphorylation. *J Biol Chem.* 286 (28), 25187-200.

Yassa, M.A., y Stark, C.E. (2011). Pattern separation in the hippocampus. *Trends Neurosci.* 34, 515–525.

Yiannakas, A. y Rosenblum, K. (2017). The Insula and Taste Learning. *Front Mol Neurosci.* 10, 355.

Zalutsky, R.A. y Nicoll, R.A. (1990). Comparison of two forms of long-term potentiation in single hippocampal neurons. *Science.* 248 (4963), 1619-24.

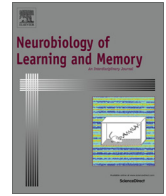
Zhang, B, Chuang, K.H., Ci'en, T., Chen, W.C., Sheu, F. S. y Routtenberg, A. (2016). Spatial memory training induces morphological changes detected by manganese enhanced MRI in the hippocampal CA3 mossy fiber terminal zone. *Neuroimage.* 128, 227-237.

Zhang, N. y Houser, C.R. (1999). Ultrastructural localization of dynorphin in the dentate gyrus in human temporal lobe epilepsy: a study of reorganized mossy fiber synapses. *J Comp Neurol.* 405, 472- 490.

Zhou, Y.Q., Takahashi, E., Li, W., Halt, A.R., Wiltgen, B., Ehninger, D., Li, G., Hell, J.W., Kennedy, M.B., y Silva, A.J. (2007). Interactions between the NR2B receptor and CaMKII modulate synaptic plasticity and spatial learning. *J Neurosci.* 27 (50), 13843-53.

ANEXO I

El anexo 1 corresponde al artículo de investigación que reporta los hallazgos del papel que desempeña CaMKII en el mantenimiento de la LTP en la vía de las fibras musgosas hipocampales y en la reorganización sináptica característica de dicha región.



Short communication

CaMKII requirement for the persistence of in vivo hippocampal mossy fiber synaptic plasticity and structural reorganization



Yectivani Juárez-Muñoz, Alejandro Rivera-Olvera, Laura E. Ramos-Languren, Martha L. Escobar*

División de Investigación y Estudios de Posgrado, Facultad de Psicología, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 August 2016

Revised 25 November 2016

Accepted 23 December 2016

Available online 27 December 2016

Keywords:

Mossy fiber

CaMKII

LTP

Synaptogenesis

Memory persistence

ABSTRACT

CaMKII has been proposed as a molecular substrate for long-term memory storage due to its capacity to maintain an active autophosphorylated state even after the decay of the external stimuli. The hippocampal mossy fiber-CA3 pathway (MF-CA3) is considered as a relevant area for acquisition and storage of different learning tasks. MF-CA3 pathway exhibits a form of LTP characterized by a slow initial increase in the EPSP slope that is independent of NMDA receptors activation. Our previous studies show that application of high frequency stimulation sufficient to elicit MF-CA3 LTP produces structural reorganization, in a manner independent of LTP induction, at the stratum oriens of hippocampal CA3 area 7 days after stimulation. However, the molecular mechanisms that underlie the maintenance of MF-CA3 LTP as well as the concomitant structural reorganization in this area remain to be elucidated. Here we show that acute microinfusion of myr-CaMKIINtide, a noncompetitive inhibitor of CaMKII, in the hippocampal CA3 area of adult rats during the late-phase of in vivo MF-CA3 LTP blocked its maintenance and prevented the accompanying morphological reorganization in CA3 area. These findings support the idea that CaMKII is a key molecular substrate for the long-term hippocampal synaptic plasticity maintenance.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

It is widely accepted that learning and memory rely on long-lasting activity dependent changes in synaptic efficiency. Long-term potentiation (LTP) is a long-lasting enhancement of synaptic strength and several studies have revealed that the long-lasting maintenance of LTP is accompanied by changes in the synaptic morphology that accompany the increment in synaptic efficiency (Lynch, Rex, & Gall, 2007). The hippocampal mossy fiber-CA3 pathway (MF-CA3) is considered as a relevant area for acquisition and storage of information. MF-CA3 LTP exhibits a form of LTP characterized by a slow initial increase in the EPSP slope that has been related to an independence of NMDA receptors activation (Nicoll & Schmitz, 2005). In previous studies, we had reported that application of high-frequency stimulation (HFS) sufficient to elicit LTP induced synaptogenesis, in a manner independent of LTP induction. Seven days after electrophysiological recordings, a band of Timm's staining, a frequently used marker to visualize MF buttons, revealed reorganization of mossy fiber connections at the stratum oriens (SO) of the CA3 area (Escobar, Barea, Derrick, Reyes, &

Martinez, 1997; Gomez-Palacio-Schjetnan & Escobar, 2008; Ramos-Languren & Escobar, 2013; Schjetnan & Escobar, 2012). However, the molecular mechanisms that underlie the maintenance of long-lasting enhancement of synaptic transmission at MF-CA3 pathway remain to be elucidated.

It has been shown that calcium/calmodulin dependent protein kinase II (CaMKII) has an important role in LTP (Lisman, Yasuda, & Raghavachari, 2012). Impairment of CaMKII function through pharmacological (Malinow, Schulman, & Tsien, 1989) or genetic (Silva, Stevens, Tonegawa, & Wang, 1992) manipulations produce severe deficits in LTP. Activity-dependent increases in calcium concentration lead to CaMKII autophosphorylation. Since the increase in CaMKII autophosphorylation has been observed up to 8 h after stimulation (Ahmed & Frey, 2005) it has been proposed that CaMKII plays a central role not only in LTP induction, but also in the maintenance of synaptic potentiation (Lisman et al., 2012). In this regard, synaptic potentiation in hippocampal CA1 region is reverted when ant-CaMKIINtide, a noncompetitive inhibitor of CaMKII, is applied during the maintenance phase of CA1-LTP in vitro (Sanhueza, McIntyre, & Lisman, 2007; Sanhueza et al., 2011). The increase in synaptic activity also produces a translocation of CaMKII from the cytoplasm to the synapse (Otmakhov et al., 2004), where it interacts with several proteins such as NMDA receptors, densin-180, α -actinin and F-actin (Baucum, Shonesy,

* Corresponding author at: División de Investigación y Estudios de Posgrado, Facultad de Psicología, Universidad Nacional Autónoma de México, C.P. 04510, CDMX, México, Mexico.

E-mail address: mescobar@unam.mx (M.L. Escobar).

Rose, & Colbran, 2015; Bayer et al., 2006; Fink et al., 2003; Strack, McNeil, & Colbran, 2000; Walikonis et al., 2001), helping to sustain the activity dependent morphological changes implicated in memory maintenance (Jourdain, Fukunaga, & Muller, 2003).

Progress has been made in elucidating the contribution of CaMKII in the induction of LTP, but little is known about its role in the maintenance phase and in the sustained morphological changes accompanying the persistence of memories. Thus, in the present work we evaluated the role of CaMKII in the maintenance of in vivo MF-CA3 LTP, as well as, in the concomitant structural CA3 reorganization.

2. Methods

2.1. Animals

Thirty-nine male Wistar rats, weighing 360–390 g were used in the present study. They were housed individually under a 12/12-h light-dark cycle, with food and water available ad libitum and an average room temperature of 22 °C. Methods were carried out using adequate measures to minimize pain or discomfort in accordance with the guidelines of the Norma Oficial Mexicana and with the approval of the Local Animal Care Committee.

2.2. Electrophysiological procedure

Electrophysiological recordings at the MF pathway were performed in anesthetized animals as previously described (Ramos-Languren & Escobar, 2013; Schjetnan & Escobar, 2012; see Fig. 1A). Briefly, rats were anesthetized with pentobarbital (50 mg/kg i.p.), and given supplemental pentobarbital injections (10 mg/kg) at 1-h intervals to maintain a surgical level of anesthesia. Body temperature was maintained at 35 °C with a heating pad. Responses were recorded by using monopolar microinfusion electrodes placed in the *stratum lucidum* above the CA3 pyramidal layer of the dorsal

hippocampus at the following stereotaxic coordinates: AP 2.9 mm, ML +2.2 mm, DV 3.0 mm (Paxinos & Watson, 2007). Responses were evoked using a bipolar electrode via direct and unilateral stimulation of the MF at coordinates AP 3.5 mm, ML 2.0 mm, DV 3.1 mm (Paxinos & Watson, 2007; Fig. 1A). The evoked responses were stored for offline analysis using BrainWave software (DataWave, Broomfield, CO, USA). Low-frequency (0.05 Hz) responses were evoked for a 20-min baseline period, after which HFS (three trains/100 Hz/1 s/ 20 s intertrain interval) was applied and evoked responses were collected for 3 h. MF-LTP was calculated as a percentage change compared with the mean slope of the field potentials of the entire baseline period prior to HFS delivery. The metabotropic glutamate receptor II agonist 2-(2,3-dicarboxy-cyclopropyl) glycine (DCG-IV; Tocris, Ellisville, MO, USA; 0.5 μ L of 0.5 μ M in 5 min), was used at the end of the electrophysiological recordings to verify that the signal was generated by MF inputs (Calixto, Thiels, Klann, & Barrionuevo, 2003).

2.3. Experimental design

Animals were divided into the following groups: (1) HFS group ($n = 7$), which had electrodes implanted and received HFS capable of inducing LTP; (2) HFS + Ntide group ($n = 7$), which in the same conditions of HFS group received intrahippocampal CA3 microinfusion of the high affinity CaMKII noncompetitive inhibitor myr-CaMKIINtide, which only binds to the activated conformation of CaMKII (5 μ M/ μ l ACSF/0.02 μ l/min; Gomez-Monterrey et al., 2013; Sanhueza et al., 2007) prepared with artificial cerebrospinal fluid (ACSF) as vehicle two hours after HFS delivery; (3) HFS + ACSF group ($n = 7$) which under the same conditions as the HFS + Ntide group, received intrahippocampal microinfusion of ACSF (1 μ L); (4) BL + Ntide group ($n = 7$) which had electrodes implanted and without prior manipulation received intrahippocampal microinfusion of myr-CaMKIINtide (5 μ M/ μ l ACSF/0.02 μ l/min); (5) intact control group (CON, $n = 5$), that was used for morphological analysis.

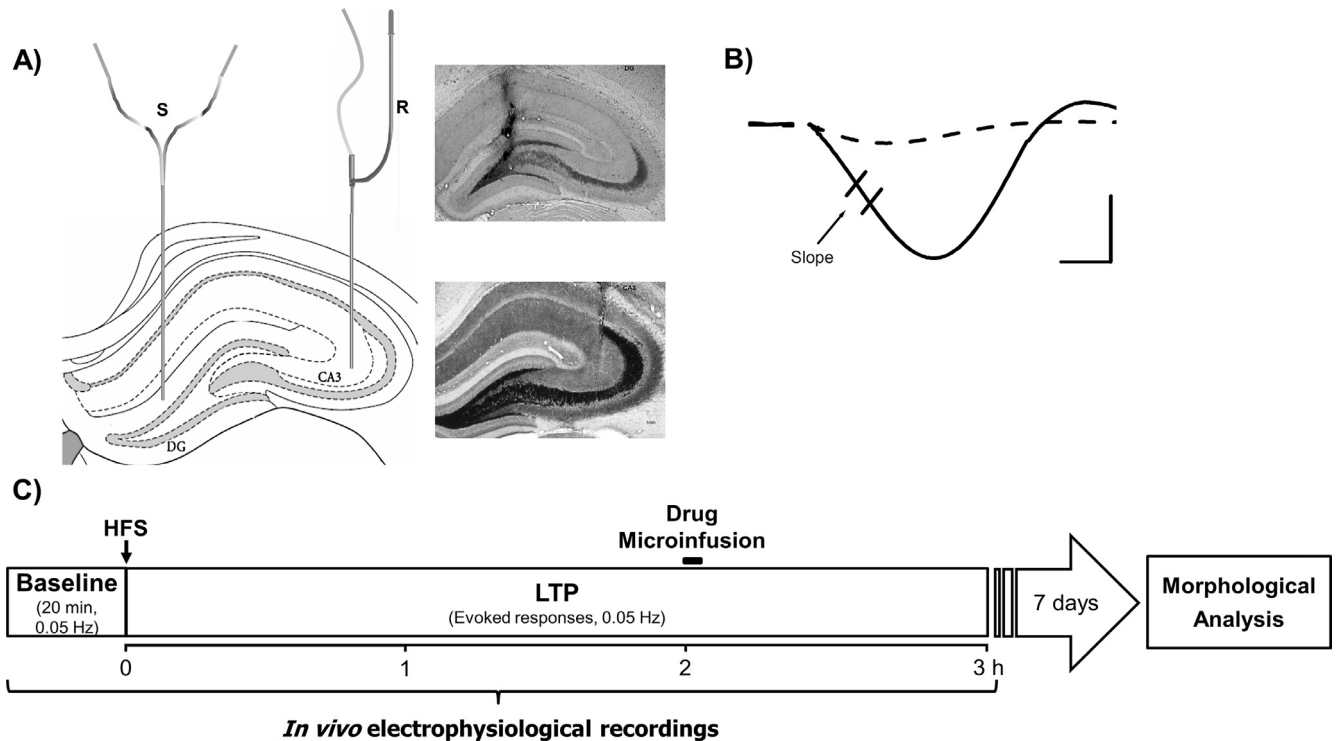


Fig. 1. (A) Schematic representation and representative images of electrode placement showing the stimulated (S) and recorded (R) sites in a coronal plane. Scale bar: 1 mm. DG: Dentate Gyrus. (B) Representative traces of the EPSP showing the component for slope measures, obtained at baseline (full line) and after DCG-IV application (dotted line). Note that DCG-IV selectively blocked MF responses. Scale bar: 5 ms and 0.25 mV. (C) Schematic representation of the experimental procedure.

2.4. Histological procedure

Mossy fiber remodeling was assessed 7 days after the electrophysiological procedure using hippocampal tissue from all groups (five animals per group). Two previously reported methods were used (Ramirez-Amaya, Balderas, Sandoval, Escobar, & Bermudez-Rattoni, 2001; Ramos-Languren & Escobar, 2013; Rekart, Sandoval, Bermudez-Rattoni, & Routtenberg, 2007; Schjetnan & Escobar, 2012). Brains were sectioned at 40 μm in the coronal plane and processed for Timm's staining. Every fifth section was systematically chosen from the extreme septal pole of the dorsal hippocampus for a total of six sections/animal. Digital images were first analyzed by using image analysis software (Scion Image; Scion Corporation, Frederick, MD). The surface area occupied by Timm's granules in the stratum oriens (SO) and stratum pyramidale (SP) was measured in each image. The areas for the SO and SP were combined (SOSP) since they are hard to distinguish, particularly proximal to CA3c (Rekart et al., 2007). Complementary unbiased areal measurements of the same digital images were carried out in the manner described by Rekart et al. (2007). Images were coded and a point-counting grid (squares = 25 μm side) digitally superimposed. Grid intersections overlying dark Timm's silver precipitate were counted as belonging either to the stratum lucidum (SL) or to the SOSP. Following the densitometric analysis by either of the two measurement methodologies, comparisons among groups were made by using the ratio of the estimated area in SOSP to the estimated area in SL to account for any size differences among individual animals (Rekart et al., 2007).

2.5. Western blot procedure

In order to analyze the state of phosphorylation of CaMKII in the presence of myrCaMKIINtide, three additional animals from each

of HFS + ACSF and HFS + Ntide groups were decapitated and the ipsilateral recorded CA3 area was microdissected, 130 min after HFS application (i.e. 10 min after myr-CaMKIINtide administration). The tissues were subsequently sonicated into a lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 20 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10% glycerol, 10% triton) supplemented with 10 mM protease inhibitors (Mini Complete, Roche, Mannheim, Germany); as well as, with phosphatase inhibitors (50 mM NaF, 4 mM Na_3VO_4 , 10 mM NaPPi). Following sonication, samples were centrifuged at 14,000 rpm for 20 min at 4 $^\circ\text{C}$ and the supernatant was obtained. Protein concentration was measured using Bradford assay, with bovine serum albumin as standard. An equivalent amount of protein for each sample was resolved in 12% SDS-acrylamide gels; blotted electrophoretically and blocked 90 min in TBST buffer (Tris buffered saline containing 0.01%, Tween-20, pH 7.4) containing 5% non-fat milk. Membranes were incubated with anti-phospho-CaMKII antibody (1:1000, Millipore, Darmstadt, Germany) for the detection of phosphorylated form of CaMKII and with anti-CaMKII antibody (1:1000, Gibco, BRL, IL) for CaMKII total. The phosphorylated isoform was normalized to the total isoform as a ratio; phospho-CaMKII/total CaMKII. We performed densitometry using the software off-line ImageJ (NIH, USA).

3. Results

3.1. CaMKII is necessary for the maintenance of in vivo HFS induced potentiation of synaptic transmission at MF-CA3 pathway of adult rats

The CA3 EPSP consisted of potentials of 0.40 ± 0.01 mV (mean \pm SEM), elicited with 20–40 μA current pulses of 0.1–0.25 ms duration. These responses initiate at 1.2–3.1 ms post-stimulation and presented their valley at 6.8 ms with an average slope of 0.63 ± 0.01 (mean \pm SEM; Fig. 1). Microinfusion of DCGIV

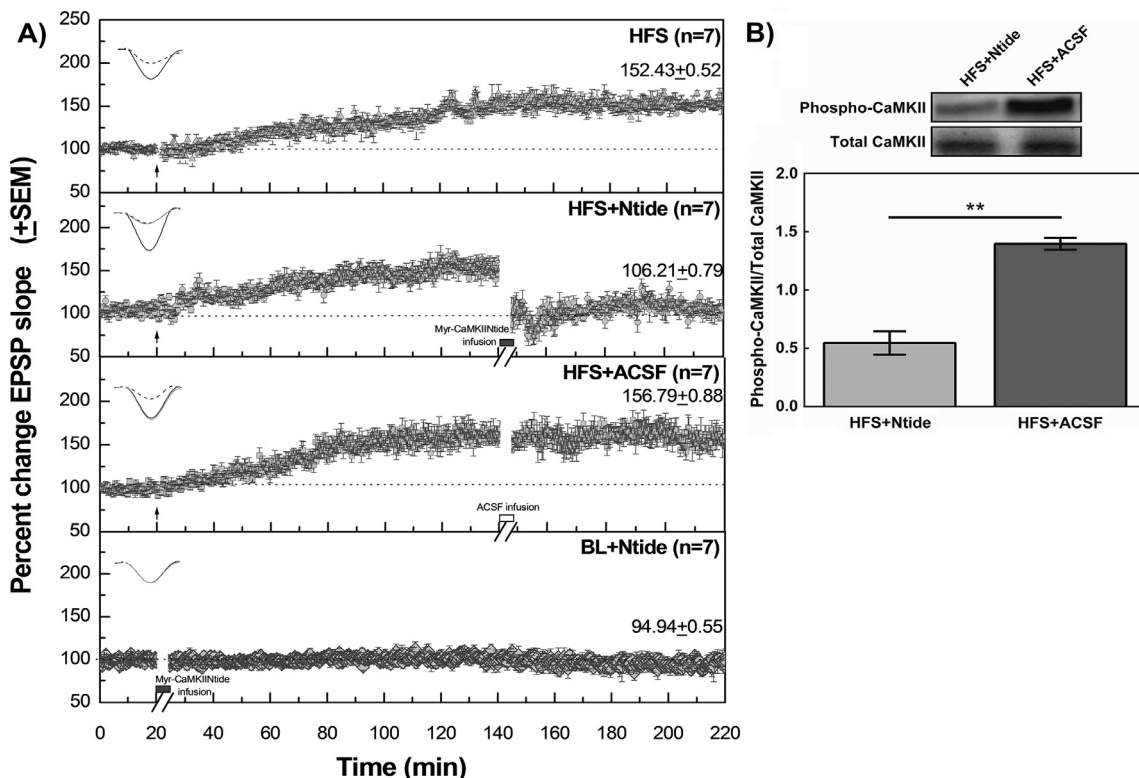


Fig. 2. CaMKII inhibition reverts MF-LTP. (A) Plot of MF-evoked responses from HFS, HFS + Ntide, HFS + ACSF and BL + Ntide groups. Note that the inhibition of CaMKII reverts MF potentiation. The top of each graph shows average of MF field potentials obtained immediately before (full line), 120 min after HFS (dotted line) and 60 min after infusion (gray line). Arrows indicate HFS delivery. Bars indicate the infusion period (5 min). (B) Representative Western blots and densitometric analysis of CaMKII phosphorylation from HFS + Ntide and HFS + ACSF groups. Note that infusion of the inhibitor during MF-LTP maintenance phase decreased phosphorylation of CaMKII. ** $p < 0.01$.

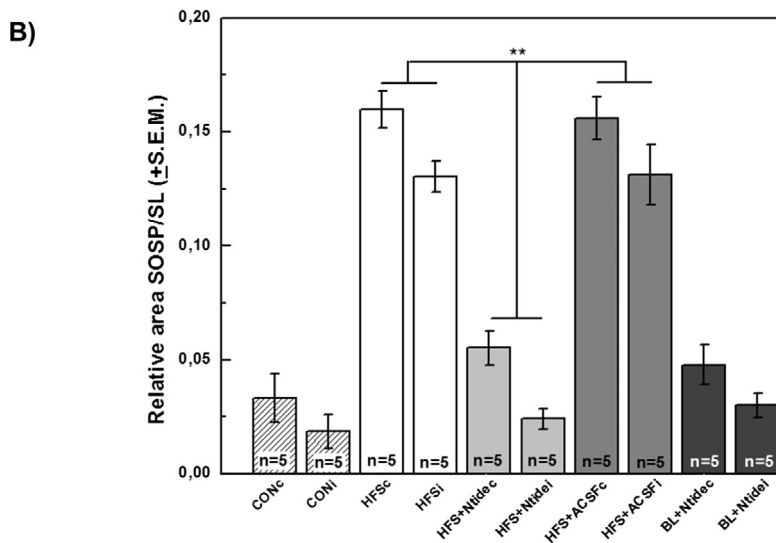
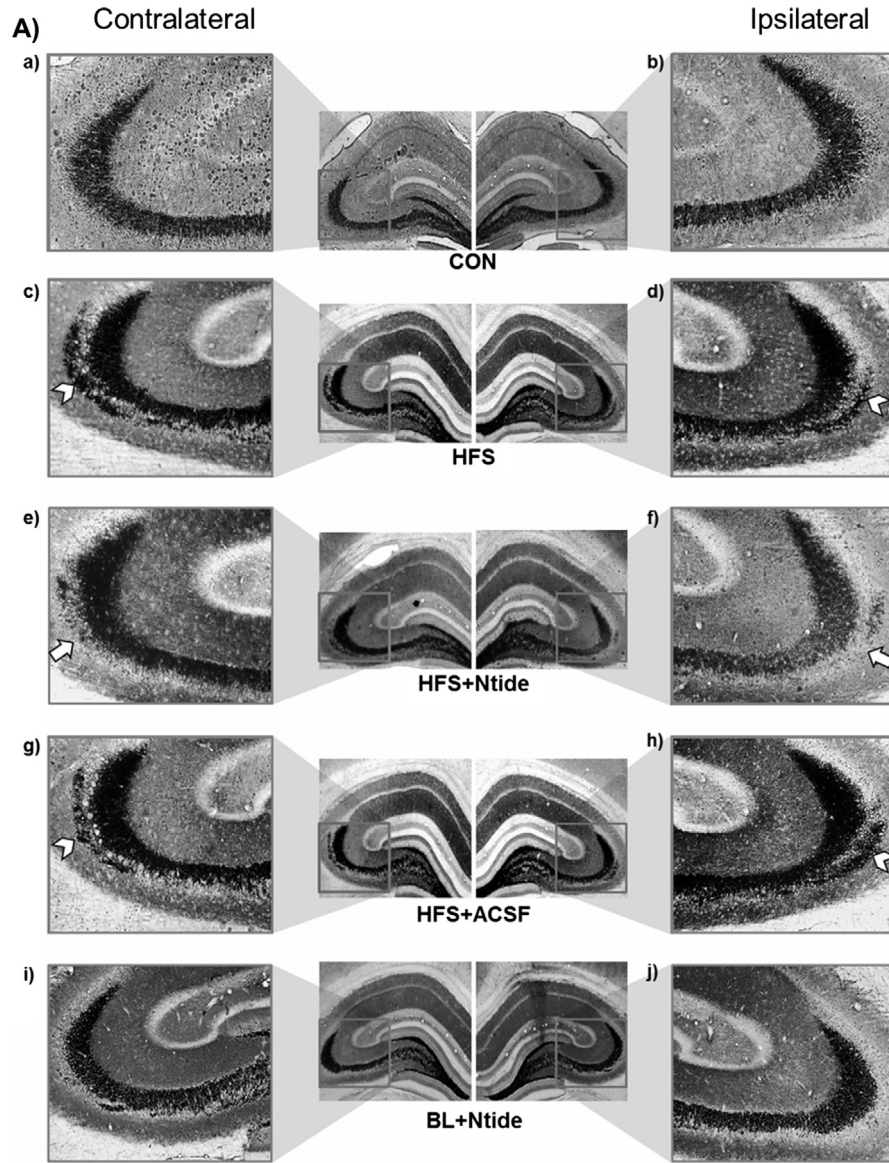


Fig. 3. CaMKII inhibition prevents the activity-dependent morphological reorganization of hippocampal mossy fibers. (A) Coronal sections of dorsal hippocampus from intact control (CON, a and b), HFS (c and d), HFS + CaMKIIINtide (e and f) HFS + ACSF (g and h), and BL + CaMKII (i and j) groups, showing the distribution of Timm-stained MFs at the stratum lucidum and SOSP. Note that CaMKII inhibition prevents the synaptic reorganization pattern (arrows) observed in HFS and HFS + ACSF groups (Arrowheads). (B) Densitometric analysis of CaMKII inhibition on synaptic reorganization of hippocampal MFs. Graphic shows the relative area (SOSP/SL) of Timm's staining of the dorsal hippocampus of all groups. c, contralateral; i, ipsilateral. ** $p < 0.001$.

at the end of the electrophysiological recordings, selectively blocked MF responses to a 22% of baseline signals presenting potentials of 0.27 ± 0.01 mV (mean \pm SEM), with a mean slope of 0.14 ± 0.01 (mean \pm SEM), verifying that the signal was generated by MF inputs (Fig. 1).

HFS produced an enhancement in the CA3 field EPSP slope values that started approximately 20 min after the stimulation, reaching a stable plateau at 1 h and with duration of at least 3 h. The application of myr-CaMKIINtide ($5 \mu\text{g}/1 \mu\text{l}$) in the CA3 region (HFS + Ntide group) blocked the maintenance phase of synaptic potentiation when the inhibitor was applied 2 h after HFS (Fig. 2A), while infusion of ACSF ($1 \mu\text{l}$, HFS + ACSF group) had no effect over the maintenance phase of LTP. Remarkably, we did not observe any effect when the inhibitor was applied without previous stimulation (BL + Ntide group). ANOVA analysis for slope increases revealed highly significant group differences ($F_{3,24} = 27.255$; $P < 0.001$). Post-hoc analysis with Fisher's test showed significant differences between the HFS + Ntide group and all the groups that received HFS ($P < 0.001$). At 1 h post-infusion, the percent changes (\pm SEM) in the EPSP slope for the HFS, HFS + Ntide, HFS + ACSF and BL + Ntide groups were 152.43 ± 0.52 , 106.21 ± 0.79 , 156.79 ± 0.88 and 94.94 ± 0.55 respectively.

Western blot analysis showed that CaMKII phosphorylation was decreased by myr-CaMKIINtide administration. As shown in Fig. 2B, the administration of myr-CaMKIINtide during the maintenance phase of synaptic potentiation, decreased CaMKII phosphorylation in the CA3 region of animals from group HFS + Ntide, as compared to HFS + ACSF group (Unpaired t test; $t = 7.6$; $p < 0.001$). No changes were observed in CaMKII total expression.

3.2. CaMKII is necessary for the sustained morphological reorganization accompanying HFS induced potentiation at MF-CA3 pathway

Our morphological analysis showed that intact control animals (CON) presented MF buttons almost exclusively in the SL of the hippocampal CA3 area (Fig. 3) in agreement with previous studies (Gomez-Palacio-Schjetnan & Escobar, 2008; Ramirez-Amaya et al., 2001; Ramos-Languren & Escobar, 2013; Rekart et al., 2007; Schjetnan & Escobar, 2012). HFS at the hippocampal MF-CA3 pathway elicited a bilateral increment of MF buttons, with a prominent contralateral enhancement visualized by the Timm's stained density at the CA3 infrapyramidal band (SOSP). Seven days after LTP induction, Timm's stained granules were observed at the SOSP of HFS and HFS + ACSF groups (Fig. 3). This increment was prevented by myr-CaMKIINtide administration 2 h after application of HFS (HFS + Ntide group). ANOVA of the average Timm positive surface area, obtained by quantitative densitometric analysis of the SOSP from each animal, revealed significant group differences ($F_{4,20} = 15.35$, $P < 0.001$). Post-hoc analysis with Fisher's test revealed that group HFS + Ntide showed a significantly smaller area of Timm-stained granules ($P < 0.001$) compared to HFS and HFS + ACSF groups. No differences were observed with CON and BL + Ntide groups. Similar results were obtained by the measures performed with the point counting grid, where the ANOVA also presents significant differences among groups ($F_{4,20} = 50.29$; $P < 0.001$).

4. Discussion

The changes in synaptic efficiency that lead to the strengthening of synapses have been proposed as the molecular substrate of learning and memory. The results presented here demonstrate that CaMKII is necessary for the maintenance of in vivo HFS induced potentiation of synaptic transmission at MF-CA3 pathway, consid-

ered as an important excitatory circuit implicated in the acquisition and storage of different learning tasks. The application of the noncompetitive CaMKII inhibitor, myr-CaMKIINtide, suppressed the maintenance phase of synaptic potentiation. The suppression can be attributed to a decrease in the CaMKII phosphorylation, as confirmed by the immunoblot analysis. Research on the role of CaMKII in the maintenance of LTP is still scarce, in this regard Sanhueza and cols, have reported that application of an inhibitor of CaMKII lead to the decrement of synaptic potentiation during the maintenance phase of in vitro NMDA receptors dependent LTP in CA1 region (Sanhueza et al., 2007; Sanhueza et al., 2011). The interaction of CaMKII with NMDA receptors has been well-established, but CaMKII also interacts with and phosphorylates a large number of synaptic proteins (Baucum et al., 2015).

MF-CA3 pathway exhibits a form of LTP that is independent of NMDA receptors activation (Derrick, Rodríguez, Liebermaman & Martínez, 1992; Evstratova & Tóth, 2014; Nicoll & Schmitz, 2005). In fact, some evidence point to exclusive contribution of presynaptic mechanisms, including increase in presynaptic calcium currents and the activation of adenylyl cyclase-cAMP cascade (Weisskopf, Castillo, Zalutsky, & Nicoll, 1994; Zalutsky & Nicoll, 1990). On this subject, it has been reported that presynaptic application of a CaMKII inhibitor blocks LTP in cultured hippocampal neurons (Ninan & Arancio, 2004). Consistent with this it has been shown that CaMKII presynaptically regulates vesicle dynamics, as well as, the release of neurotransmitters, neuropeptides, and neurotrophins (Carrillo, Olsen, Yoon, & Keshishian, 2010; He, Yang, Xie, & Lu, 2000; Shakiryanova et al., 2007). There are also data suggesting that activation of presynaptic kainate receptors (KARs) and calcium release from internal stores might be involved as part of the mechanisms underlying MF-LTP (Bortolotto, Lauri, Isaac, & Collingridge, 2003). In this regard, it has been shown that repeated pairing of pre- and postsynaptic stimulation at hippocampal MF synapses induces synaptic plasticity of KAR-mediated responses and that CaMKII regulates this modification through direct phosphorylation of KARs (Carta et al., 2013).

Alternatively, several studies shed light on the importance of postsynaptic calcium signaling associated with voltage-gated calcium channels and metabotropic glutamate receptors in MF-LTP (Kapur, Yeckel, Gray, & Johnston, 1998; Kapur, Yeckel, & Johnston, 2001). In this line of ideas, it has been demonstrated that inhibition of K^+ -driven mossy fiber synaptogenesis by pharmacological blockade of L-type Ca^{2+} channels is dependent on CaMKII modulation (Ikegaya, Nishiyama, & Matsuki, 2000). Similarly, it has been reported that CaMKII also activates intracellular receptors leading to calcium release from internal stores, indeed, it has been demonstrated that PKC activation lead to an increase in postsynaptic expression of autophosphorylated CaMKII and that both kinases activate inositol-1,4,5-trisphosphate receptors or ryanodine receptors through direct phosphorylation (Yan et al., 2011).

On the other hand, our previous studies show that brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is highly relevant in the regulation of MF-CA3-LTP (Gómez-Palacio and Escobar, 2008; Schjetnan & Escobar, 2012). In this regard it has been shown that infusion of recombinant BDNF at a dose that facilitates LTM retention also increased CaMKII autophosphorylation in the parietal cortex (Alonso et al., 2005). Likewise, in the hippocampus it has been demonstrated that once activated by BDNF, CaMKII in turn activates the p38 subfamily of mitogen-activated protein kinases (MAPK) and its downstream effector MAP-activated protein kinase 2 (MAPKAPK 2) eliciting nuclear CREB phosphorylation at Ser-133, a positive regulatory site (Blanquet, Mariani, & Derer, 2003).

Morphological reorganization as a result of activity is believed to sustain stabilization of synaptic plasticity (Lynch et al., 2007). Our present findings reveal that the increment of hippocampal MF buttons, elicited by HFS at the SOSP of the CA3 area was pre-

vented by the application of CaMKII inhibitor during the maintenance phase of MF-LTP. In this regard, it has been described that the increase in synaptic activity produces a translocation of CaMKII from the cytoplasm to the synapse (Bayer et al., 2006; Otmakhov et al., 2004; Tao-Cheng, Dosemeci, Winters, & Reese, 2006), where it contributes to synaptic reorganization (Fink et al., 2003). In cultured cerebellar granule neurons CaMKII facilitates activity-dependent dendritic growth (Gaudilliere, Konishi, de la Iglesia, Yao, & Bonni, 2004). In the same line of ideas, it has been reported that in organotypic hippocampal slice cultures, intracellular injection of an activated form of CaMKII induced LTP, as well as, the formation of new dendritic spines and filopodial growth, while CaMKII inhibitors blocked morphological changes produced by LTP induction (Jourdain et al., 2003). In addition, it was recently reported that CaMKII heterozygous knock-out mice have a deficient morphogenic granule cell profile in the dentate gyrus, showing a mossy fiber split to invade regions that normally are not innervated by this fibers (Nakahara, Miyake, Tajinda, & Ito, 2015). Concerning this matter, several studies have demonstrated the interaction of CaMKII with actin polymerization (Kim et al., 2015), as well as with enzymes of the Rho/Rac family controlling spine dynamics, turnover and morphology (Murakoshi, Wang, & Yasuda, 2011).

In summary, our present results show that inhibition of CaMKII in the hippocampal CA3 area during the late-phase of in vivo MF-CA3 LTP impairs its maintenance and blocks the concomitant synaptic reorganization. These findings support the notion that CaMKII is a key molecular substrate for the long-term synaptic plasticity maintenance.

Acknowledgements

This research was supported by PAPIIT IN-215816 and CONACYT 367853. We thank Dr. Gloria Benítez-King who generously provided us with the CaMKII antibody and Dr. Luis F. Rodríguez-Durán, as well as, Dr. Perla Moreno Castilla for technical assistance.

References

- Ahmed, T., & Frey, J. U. (2005). Plasticity-specific phosphorylation of CaMKII, MAP-kinases and CREB during late-LTP in rat hippocampal Slices in vitro. *Neuropharmacology*, 49, 477–492.
- Alonso, M., Bekinschtein, P., Cammarota, M., Vianna, M. R., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2005). Endogenous BDNF is required for long-term memory formation in the rat parietal cortex. *Learn Mem.*, 5, 504–510.
- Baucum, A. J., 2nd, Shonesy, B. C., Rose, K. L., & Colbran, R. J. (2015). Quantitative proteomics analysis of CaMKII phosphorylation and the CaMKII interactome in the mouse forebrain. *ACS Chemical Neuroscience*, 6(4), 615–631.
- Bayer, K. U., LeBel, E., McDonald, G. L., O'Leary, H., Schulman, H., & De Koninck, P. (2006). Transition from reversible to persistent binding of CaMKII to postsynaptic sites and NR2B. *Journal of Neuroscience*, 26(4), 1164–1174.
- Blanquet, P. R., Mariani, J., & Derer, J. (2003). A calcium/calmodulin kinase pathway connects brain-derived neurotrophic factor to the cyclic AMP-responsive transcription factor in the rat hippocampus. *Neuroscience*, 118(2), 477–490.
- Bortolotto, Z. A., Lauri, S., Isaac, J. T., & Collingridge, G. L. (2003). Kainate receptors and the induction of mossy fibre long-term potentiation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 358, 657–666.
- Calixto, E., Thiels, E., Klann, E., & Barriounevo, G. (2003). Early maintenance of hippocampal mossy fiber–long-term potentiation depends on protein and RNA synthesis and presynaptic granule cell integrity. *Journal of Neuroscience*, 23, 4842–4849.
- Carrillo, R. A., Olsen, D. P., Yoon, K. S., & Keshishian, H. (2010). Presynaptic activity and CaMKII modulate retrograde semaphorin signaling and synaptic refinement. *Neuron*, 68, 32–44.
- Carta, M., Opazo, P., Veran, J., Athané, A., Choquet, D., Coussen, F., & Mulle, C. (2013). CaMKII-dependent phosphorylation of GluK5 mediates plasticity of kainate receptors. *EMBO Journal*, 32(4), 496–510.
- Derrick, B. E., Rodriguez, S. B., Lieberman, D. N., & Martinez, J. L. Jr., (1992). Mu opioid receptors are associated with the induction of hippocampal mossy fiber long-term potentiation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 263(2), 725–733.
- Escobar, M. L., Barea, E., Derrick, B., Reyes, J., & Martinez, J. L. (1997). Opioid receptor modulation of mossy fiber synaptogenesis: Independence from long-term potentiation. *Brain Research*, 751, 330–335.
- Evstratova, A., & Tóth, K. (2014). Information processing and synaptic plasticity at hippocampal mossy fiber terminals. *Front Cell Neuroscience*, 8, 28.
- Fink, C. C., Bayer, K. U., Myers, J. W., Ferrell, J. E., Jr., Schulman, H., & Meyer, T. (2003). Selective regulation of neurite extension and synapse formation by the β but not the α isoform of CaMKII. *Neuron*, 39, 283–297.
- Gaudilliere, B., Konishi, Y., de la Iglesia, N., Yao, G., & Bonni, A. (2004). A CaMKII-NeuroD signaling pathway specifies dendritic morphogenesis. *Neuron*, 41, 229–241.
- Gomez-Monterrey, I., Sala, M., Rusciano, M. R., Monaco, S., Maione, A. S., Iaccarino, G., ... Campiglia, P. (2013). Characterization of a selective CaMKII peptide inhibitor. *European Journal of Medical Chemistry*, 62, 425–434.
- Gomez-Palacio-Schjetnan, A., & Escobar, M. L. (2008). In vivo BDNF modulation of adult functional and morphological synaptic plasticity at hippocampal mossy fibers. *Neuroscience Letters*, 445(1), 62–67.
- He, X., Yang, F., Xie, Z., & Lu, B. (2000). Intracellular Ca and Ca/calmodulin dependent kinase II mediate acute potentiation of neurotransmitter release by neurotrophin-3. *Journal of Cell Biology*, 149, 783–792.
- Ikegaya, Y., Nishiyama, N., & Matsuki, N. (2000). L-type Ca(2+) channel blocker inhibits mossy fiber sprouting and cognitive deficits following pilocarpine seizures in immature mice. *Neuroscience*, 98(4), 647–659.
- Jourdain, P., Fukunaga, K., & Muller, D. (2003). Calcium/calmodulin dependent protein kinase II contributes to activity-dependent filopodia growth and spine formation. *Journal of Neuroscience*, 23, 10645–10649.
- Kapur, A., Yeckel, M. F., Gray, R., & Johnston, D. (1998). L-type calcium channels are required for one form of hippocampal mossy fiber LTP. *Journal of Neurophysiology*, 79, 2181–2190.
- Kapur, A., Yeckel, M., & Johnston, D. (2001). Hippocampal mossy fiber activity evokes Ca²⁺ release in CA3 pyramidal neurons via a metabotropic glutamate receptor pathway. *Neuroscience*, 107, 59–69.
- Kim, K., Lakhanpal, G., Lu, H. E., Khan, M., Suzuki, A., Hayashi, M. K., ... Okamoto, K. (2015). A temporary gating of actin remodeling during synaptic plasticity consists of the interplay between the kinase and structural functions of CaMKII. *Neuron*, 87(4), 813–826.
- Lisman, J., Yasuda, R., & Raghavachari, S. (2012). Mechanisms of CaMKII action in long term potentiation. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(3), 169–182.
- Lynch, G., Rex, C. S., & Gall, C. M. (2007). LTP consolidation: substrates, explanatory power, and functional significance. *Neuropharmacology*, 52, 12–23.
- Malinow, R., Schulman, H., & Tsien, R. W. (1989). Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science*, 245(4920), 862–866.
- Murakoshi, H., Wang, H., & Yasuda, R. (2011). Local, persistent activation of Rho GTPases during plasticity of single dendritic spines. *Nature*, 472(7341), 100–104.
- Nakahara, S., Miyake, S., Tajinda, K., & Ito, H. (2015). Mossy fiber mis-pathfinding and semaphorin reduction in the hippocampus of α -CaMKII hKO mice. *Neuroscience Letters*, 598, 47–51.
- Nicoll, R. A., & Schmitz, D. (2005). Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nature Reviews Neuroscience*, 6, 863–876.
- Ninan, I., & Arancio, O. (2004). Presynaptic CaMKII is necessary for synaptic plasticity in cultured hippocampal neurons. *Neuron*, 42(1), 129–141.
- Otmakhov, N., Tao-Cheng, J. H., Carpenter, S., Arican, B., Dosemeci, A., Reese, T. S., & Lisman, J. (2004). Persistent accumulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in dendritic spines after induction of NMDA receptor-dependent chemical long-term potentiation. *Journal of Neuroscience*, 24, 9324–9331.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press.
- Ramirez-Amaya, V., Balderas, I., Sandoval, J., Escobar, M. L., & Bermudez-Rattoni, F. (2001). Spatial long-term memory is related to mossy fiber synaptogenesis. *Journal of Neuroscience*, 21, 7340–7348.
- Ramos-Languren, L. E., & Escobar, M. L. (2013). Plasticity and metaplasticity of adult rat hippocampal mossy fibers induced by neurotrophin-3. *European Journal of Neuroscience*, 37(8), 1248–1259.
- Rekart, J. L., Sandoval, C. J., Bermudez-Rattoni, F., & Routtenberg, A. (2007). Remodeling of hippocampal mossy fibers is selectively induced seven days after the acquisition of a spatial but not a cued reference memory task. *Learning and Memory*, 14, 416–421.
- Sanhueza, M., Fernandez-Villalobos, G., Stein, I. S., Kasumova, G., Zhang, P., Bayer, K. U., ... Lisman, J. (2011). Role of the CaMKII/NMDA receptor complex in the maintenance of synaptic strength. *Journal of Neuroscience*, 31(25), 9170–9178.
- Sanhueza, M., McIntyre, C. C., & Lisman, J. E. (2007). Reversal of Synaptic Memory by Ca/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Inhibitor. *Journal of Neuroscience*, 19, 5190–5199.
- Schjetnan, A. G., & Escobar, M. L. (2012). In vivo BDNF modulation of hippocampal mossy fiber plasticity induced by high frequency stimulation. *Hippocampus*, 22(1), 1–8.
- Shakiryanova, D., Klose, M. K., Zhou, Y., Gu, T., Deitcher, D. L., Atwood, H. L., ... Levitan, E. S. (2007). Presynaptic ryanodine receptor-activated calmodulin kinase II increases vesicle mobility and potentiates neuropeptide release. *Journal of Neuroscience*, 27(29), 7799–7806.
- Silva, A. J., Stevens, C. F., Tonegawa, S., & Wang, Y. (1992). Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calmodulin-calmodulin kinase II mutant mice. *Science*, 256, 201–206.
- Strack, S., McNeil, R. B., & Colbran, R. J. (2000). Autophosphorylation-dependent targeting of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II by the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 275(31), 23798–23806.

- Tao-Cheng, J. H., Dosemeci, A., Winters, C. A., & Reese, T. S. (2006). Changes in the distribution of calcium calmodulin dependent protein kinase II at the presynaptic bouton after depolarization. *Brain Cell Biology*, 35, 117–124.
- Walikonis, R. S., Oguni, A., Khorosheva, E. M., Jeng, C. J., Asuncion, F. J., & Kennedy, M. B. (2001). Densin-180 forms a ternary complex with the (alpha)-subunit of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and (alpha)-actinin. *Journal of Neuroscience*, 21(2), 423–433.
- Weisskopf, M. G., Castillo, P. E., Zalutsky, R. A., & Nicoll, R. A. (1994). Mediation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by cyclic AMP. *Science*, 265, 1878–1882.
- Yan, J. Z., Xu, Z., Ren, S. Q., Hu, B., Yao, W., Wang, S. H., ... Lu, W. (2011). Protein kinase C promotes N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor trafficking by indirectly triggering calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) autophosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 286(28), 25187–25200.
- Zalutsky, R. A., & Nicoll, R. A. (1990). Comparison of two forms of long-term potentiation in single hippocampal neurons. *Science*, 248(4963), 1619–1624.

ANEXO II

El anexo 2 corresponde al artículo de investigación que reporta los hallazgos del papel que desempeña CaMKII en el mantenimiento de la LTP en la vía Bla-CI y en la persistencia de la MLP del CAS.



CaMKII Requirement for *in Vivo* Insular Cortex LTP Maintenance and CTA Memory Persistence

Yectivani Juárez-Muñoz, Laura E. Ramos-Languren and Martha L. Escobar*

División de Investigación y Estudios de Posgrado, Facultad de Psicología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

OPEN ACCESS

Edited by:

Antonella Gasbarri,
University of L'Aquila, Italy

Reviewed by:

Peter K. Giese,
King's College London,
United Kingdom
Jorge Medina,
Universidad de Buenos Aires,
Argentina
Christine Gall,
University of California, Irvine,
United States

*Correspondence:

Martha L. Escobar
mescobar@unam.mx

Specialty section:

This article was submitted to
Neuropharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 29 June 2017

Accepted: 30 October 2017

Published: 14 November 2017

Citation:

Juárez-Muñoz Y, Ramos-Languren LE
and Escobar ML (2017) CaMKII
Requirement for *in Vivo* Insular Cortex
LTP Maintenance and CTA Memory
Persistence. *Front. Pharmacol.* 8:822.
doi: 10.3389/fphar.2017.00822

Calcium-calmodulin/dependent protein kinase II (CaMKII) plays an essential role in LTP induction, but since it has the capacity to remain persistently activated even after the decay of external stimuli it has been proposed that it can also be necessary for LTP maintenance and therefore for memory persistence. It has been shown that basolateral amygdaloid nucleus (Bla) stimulation induces long-term potentiation (LTP) in the insular cortex (IC), a neocortical region implicated in the acquisition and retention of conditioned taste aversion (CTA). Our previous studies have demonstrated that induction of LTP in the Bla-IC pathway before CTA training increased the retention of this task. Although it is known that IC-LTP induction and CTA consolidation share similar molecular mechanisms, little is known about the molecular actors that underlie their maintenance. The purpose of the present study was to evaluate the role of CaMKII in the maintenance of *in vivo* Bla-IC LTP as well as in the persistence of CTA long-term memory (LTM). Our results show that acute microinfusion of myr-CaMKIINtide, a selective inhibitor of CaMKII, in the IC of adult rats during the late-phase of *in vivo* Bla-IC LTP blocked its maintenance. Moreover, the intracortical inhibition of CaMKII 24 h after CTA acquisition impairs CTA-LTM persistence. Together these results indicate that CaMKII is a central key component for the maintenance of neocortical synaptic plasticity as well as for persistence of CTA-LTM.

Keywords: CaMKII, CTA, neocortical-LTP, memory persistence, insular cortex

INTRODUCTION

Learning and memory rely on long-lasting changes in synaptic efficiency within neural networks. Long-term potentiation (LTP) is a long-lasting and activity-dependent enhancement of synaptic strength that is widely expressed across the brain (Malenka and Bear, 2004; Rodríguez-Durán et al., 2011). Studies in the neocortex and hippocampus have demonstrated that training in several learning tasks drive modifications of synaptic strength (Riout-Pedotti et al., 2000; Whitlock et al., 2006; Cooke and Bear, 2010; Liu et al., 2017; Rodríguez-Durán et al., 2017). The insular cortex (IC) is a region of the temporal neocortex implicated in the acquisition and storage of conditioned taste aversion (CTA). CTA is a well-established learning and memory paradigm in which an animal acquires aversion to a novel taste when it is associated with nausea (Bernstein and Koh, 2007; Bermúdez-Rattoni, 2014; Rivera-Olvera et al., 2016). Previous studies demonstrated that high frequency stimulation of the basolateral amygdaloid nucleus (Bla) elicits LTP in the IC (Escobar et al., 1998a,b; Jones et al., 1999). Moreover, we have shown that induction of LTP in the Bla-IC pathway before CTA training enhances the retention of this task (Escobar and Bermúdez-Rattoni, 2000; Castillo et al., 2006).

Research on the cellular basis of learning and memory has identified some key molecules involved in the processes of acquisition and consolidation of information (Lamprecht and LeDoux, 2004). However, little is known about the processes involved in the permanence of long-term memory (LTM). Recently, the search of molecular mechanisms involved in LTM storage has highlighted a significant participation of calcium/calmodulin dependent protein kinase II (CaMKII). The increase in calcium concentration after LTP induction leads to CaMKII autophosphorylation, an event that makes CaMKII activity persist even after the decay of calcium concentration (Lisman et al., 2002, 2012; Colbran and Brown, 2004). However, it has been demonstrated that this autonomous activity is only transient (Lengyel et al., 2004; Otmakhov et al., 2015; Murakoshi et al., 2017), while Thr286 phosphorylation has been proved as a persistent event, that has been observed up to 8 h after stimulation (Ahmed and Frey, 2005). In this regard, it has been observed that synaptic potentiation in hippocampal CA1 region is reverted when ant-CaMKIINtide, a noncompetitive inhibitor of CaMKII, is applied during the maintenance phase of CA1-LTP *in vitro* (Sanhueza et al., 2007). Similar results have been observed by our research group when CaMKIINtide is infused in CA3 region during the maintenance phase of *in vivo* mossy fiber (MF)-LTP (Juárez-Muñoz et al., 2017). In a recent study it has been proved that expression of a transient dominant-negative form of CaMKII erases a previously established hippocampal-dependent memory, pointing to a role of this molecule for stable memory storage (Rossetti et al., 2017). It has also been shown that training in a spatial task elicits increments in hippocampal CaMKII autophosphorylation (Tan and Liang, 1996). Furthermore, intrahippocampal pharmacogenetic inhibition of CaMKII activity impairs retention of spatial memory (Babcock et al., 2005). Importantly, it has been shown that although mice heterozygous for a CaMKII null mutation have normal memory retention for contextual fear and water maze tasks 1–3 days after training, these animals exhibit amnesia when tested 10–50 days post-training (Frankland et al., 2001), revealing a role for CaMKII in the persistence of memory.

Since little is known about the molecular actors implicated in the maintenance of synaptic plasticity and LTM, in the present work we evaluated the role of CaMKII in the maintenance of *in vivo* Bla-IC LTP as well as in the persistence of CTA-LTM.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Seventy-three male Wistar rats, weighing 360–390 g were prepared for the present study. Rats were individually caged and maintained on a 12:12 light–dark cycle at 22° C with water and food available *ad libitum* except where indicated (Martínez-Moreno et al., 2016). Experiments were performed in accordance with the Norma Oficial Mexicana and with the approval of the Animal care committee of the Faculty of Psychology of the National Autonomous University of Mexico.

Electrophysiology Procedure

Electrophysiological recordings were performed in anesthetized rats as previously described (Escobar et al., 1998a; Rodríguez-Durán et al., 2011; Rivera-Olvera et al., 2016). Briefly, rats were anesthetized with pentobarbital (50 mg/kg *i.p.*). Responses were recorded by using a monopolar microinfusion electrode placed in the IC. Constant current stimulation (50–70 μ A monophasic pulses, 0.25 ms duration) was applied to the Bla unilaterally using a stainless steel bipolar electrode. The microinfusion electrodes were coupled to 10 μ l Hamilton syringes (Reno, NV, USA) driven by a microinfusion pump (Cole Parmer Co., Vernon Hills, IL, USA). Evoked responses from IC were measured by recording the EPSP slope. During the 30 min baseline period responses were evoked at 0.05 Hz. LTP was induced by delivering 10 trains of 100 Hz/1 s with an intertrain interval of 20 s. Animals with unclear electrode placement were discarded.

Western Blot

Rats were decapitated and the ipsilateral recorded IC area was microdissected. The tissues were subsequently sonicated into a lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 20 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10% glycerol, 10% triton) supplemented with 10 mM protease inhibitors (Mini Complete, Roche, Mannheim, Germany); as well as with phosphatase inhibitors (50 mM NaF, 4 mM Na₃VO₄, 10 mM NaPPi). Following sonication, samples were centrifuged at 14,000 rpm for 20 min at 4°C and the supernatant was obtained. Protein concentration was measured using Bradford assay, with bovine serum albumin as standard. An equivalent amount of protein for each sample was resolved in 12% SDS-acrylamide gels; blotted electrophoretically and blocked 90 min in TBST buffer (Tris buffered saline containing 0.01%, Tween-20, pH 7.4) containing 5% non-fat milk (Castillo and Escobar, 2011). Membranes were incubated overnight at 4°C with anti-phospho CaMKII T286/287 antibody (1:1,000, #06-881, Millipore, Darmstadt, Germany) for the detection of phosphorylated form of CaMKII and with anti-CaMKII antibody (1:500, #5306, Santa Cruz, CA, USA) for CaMKII total. The phosphorylated isoforms were normalized to the total isoform as a ratio, which was presented as a percentage value in histograms. We performed densitometry using the software off-line ImageJ (NIH, USA).

Cannulae Implantation

Using a previously described procedure, animals were bilaterally implanted in the IC with stainless steel guide cannulae (Moguel-González et al., 2008; Rodríguez-Serrano et al., 2014). Microinjectors were attached by polyethylene tubing to a 10- μ l Hamilton syringe driven by a microinfusion pump (Cole Parmer Co., Vernon Hills, IL, USA). Animals were allowed to recover for 1 week after surgery. Histological analysis was performed on all groups to verify the injector tip location.

CTA

As previously described (Rivera-Olvera et al., 2016), 7 days after surgery animals were trained to drink water twice a day from a graduated cylinder, during 10 min trials for 3 days. On the acquisition session, water was replaced by a saccharin solution

0.1% (Sigma, St. Louis, MO), and 10 min later, animals were intraperitoneally injected with LiCl (0.15 M; 7.5 ml/kg). During the aversion test 0.1% saccharin solution was presented again after two more days of baseline consumption. The strength of aversion was measured through the reduction of saccharin consumption.

Experimental Design

To analyze the effect of CaMKII inhibition on the maintenance of Bla-IC-LTP, animals were divided into the following treatment groups: (1) HFS group ($n = 7$), which underwent surgery, had electrodes implanted and received high frequency stimulation (HFS) capable of inducing LTP; (2) HFS+CaMKIINtide group ($n = 7$), which in the same conditions of HFS group received intracortical microinfusion of myr-CaMKIINtide (5 $\mu\text{M}/\mu\text{l}$ ACSF/0.02 $\mu\text{l}/\text{min}$; Sanhueza et al., 2007; Juárez-Muñoz et al., 2017) prepared with artificial cerebrospinal fluid (ACSF) as vehicle 2 h after HFS delivery; (3) HFS+ACSF group ($n = 7$) which under the same conditions as the HFS+CaMKIINtide group, received intracortical microinfusion of ACSF (1 μl); (4) CaMKIINtide group ($n = 7$) which had electrodes implanted and without prior manipulation received intracortical microinfusion of myr-CaMKIINtide (5 $\mu\text{M}/\mu\text{l}$ ACSF/0.02 $\mu\text{l}/\text{min}$). In order to analyze the state of phosphorylation of CaMKII in the presence of myrCaMKIINtide, three additional animals from each of HFS+ACSF and HFS+CaMKIINtide groups were decapitated and tissue was obtained 130 min after HFS application (i.e., 10 min after myr-CaMKIINtide administration) (**Figure 1A**).

To evaluate the effect of CaMKII inhibition on the maintenance of CTA-LTM, animals were divided into the following treatment groups: (1) CTA+STM+CaMKIINtide group ($n = 10$), which was trained in CTA and was subjected to a short-term memory aversion test (STM) carried out 4.5 h after the acquisition in order to corroborate the association of saccharin with gastric malaise. One day after acquisition rats received bilateral intracortical microinfusion of myr-CaMKIINtide (5 $\mu\text{M}/\mu\text{l}$ ACSF/0.02 $\mu\text{l}/\text{min}$; Sanhueza et al., 2007; Juárez-Muñoz et al., 2017) prepared with artificial cerebrospinal fluid (ACSF). LTM was assessed 48 h after infusion; (2) CTA+STM+ACSF ($n = 10$), which under the same conditions of CTA+STM+CaMKIINtide group received bilateral intracortical microinfusion of ACSF (1 μl); (3) CTA+CaMKIINtide ($n = 10$), which was trained in CTA and received bilateral intracortical microinfusion of myr-CaMKIINtide in absence of STM aversion test in order to prevent the inherent interference to retrieval process (Nader and Einarsson, 2010); (4) pCTA+STM+CaMKIINtide ($n = 9$), which was pseudotrained in CTA (during the conditioning session PBS was delivered instead of LiCl) and received bilateral intracortical microinfusion of myr-CaMKIINtide (**Figure 2A**).

RESULTS

Histology

Histological examinations revealed that the stimulating and recording electrodes were correctly located in the Bla and the IC, respectively, in all animals included in the present analysis

(**Figure 1B**). Similarly, injectors were correctly placed in the IC for all groups (**Figure 2B**).

Electrophysiology

The IC EPSP consisted of potentials of 0.47 ± 0.004 mV (mean \pm SEM), elicited with 50–70 μA current pulses of 0.1–0.25 ms duration. These responses initiate at 2–3 ms post-stimulation and presented their peak at 7–9 ms with an average slope of 0.019 ± 0.003 (mean \pm SEM), in agreement with previous studies (Escobar et al., 1998a, 2002; Jones et al., 1999; Rodríguez-Durán et al., 2011).

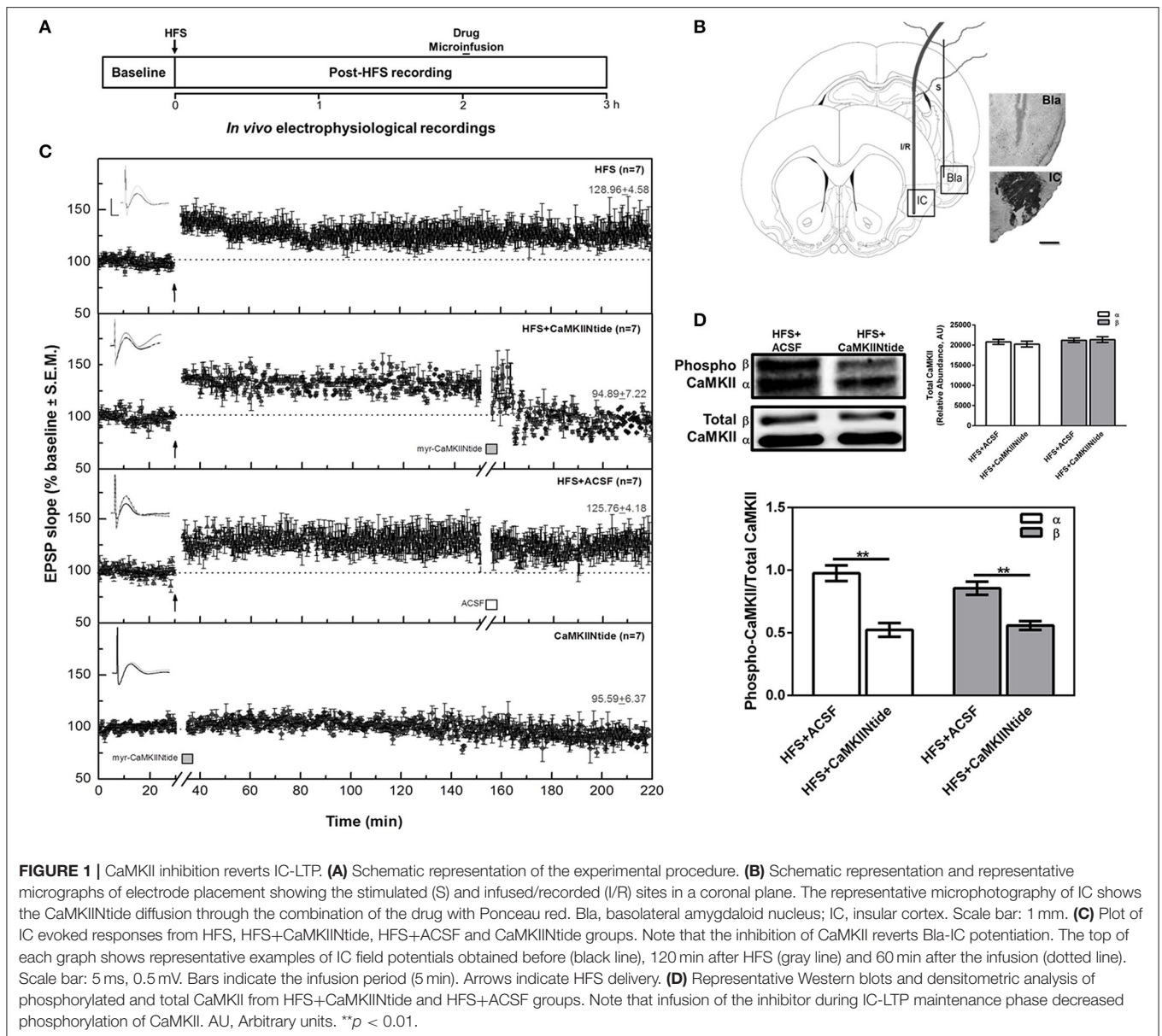
CaMKII Is Necessary for the Maintenance of *in Vivo* HFS Induced Potentiation of Synaptic Transmission at Bla-IC Pathway of Adult Rats

As previously described, HFS produced an enhancement in the IC field EPSP slope values, with a duration of at least 3 h (HFS group). The application of myr-CaMKIINtide (5 $\mu\text{g}/1$ μl) in the IC (HFS+CaMKIINtide group) blocked the maintenance phase of synaptic potentiation when the inhibitor was applied 2 h after HFS (**Figure 1C**), while infusion of ACSF (1 μl , HFS+ACSF group) had no effect over the maintenance phase of LTP. Remarkably, the application of the inhibitor in the absence of HFS did not have any effect over baseline transmission (CaMKIINtide group). ANOVA analysis for slope increases revealed highly significant group differences [$F_{(3, 24)} = 71.28$; $P < 0.001$]. *Post-hoc* analysis with Fisher's test showed significant differences between the HFS+CaMKIINtide group and all the groups that received HFS ($P < 0.001$). At 1 h post-infusion, the percent changes (\pm SEM) in the EPSP slope for the HFS, HFS+CaMKIINtide, HFS+ACSF and CaMKIINtide groups were 128.96 ± 4.58 , 94.89 ± 7.22 , 125.76 ± 4.18 , and 95.59 ± 6.37 respectively.

Western blot analysis showed that phosphorylation of the two main cortical isoforms of CaMKII (α and β) were decreased by myr-CaMKIINtide administration. As shown in **Figure 1D**, the administration of the inhibitor of CaMKII during the maintenance phase of synaptic potentiation decreased CaMKII phosphorylation in the IC region of animals from group HFS+CaMKIINtide, as compared to HFS+ACSF group [Two-Way ANOVA; $F_{(1,8)} = 52.00$; $p < 0.05$]. No changes were observed in CaMKII total expression.

CamkII Inhibition Impairs the Maintenance of CTA-LTM

No significant differences were found among groups neither in the baseline water intake nor during the acquisition session. Intracortical microinfusion of myr-CaMKIINtide 24 h after CTA acquisition lead to a memory impairment during LTM aversion test, performed 48 h after the inhibitor microinfusion, i.e., 72 h after the CTA acquisition. Two-way ANOVA revealed significant group differences [$F_{(3, 35)} = 22.75$, $p < 0.001$]. *Post-hoc* analysis with Fisher's test revealed that groups CTA+STM+CaMKIINtide and CTA+CaMKIINtide showed significant differences compared to CTA+STM+ACSF and

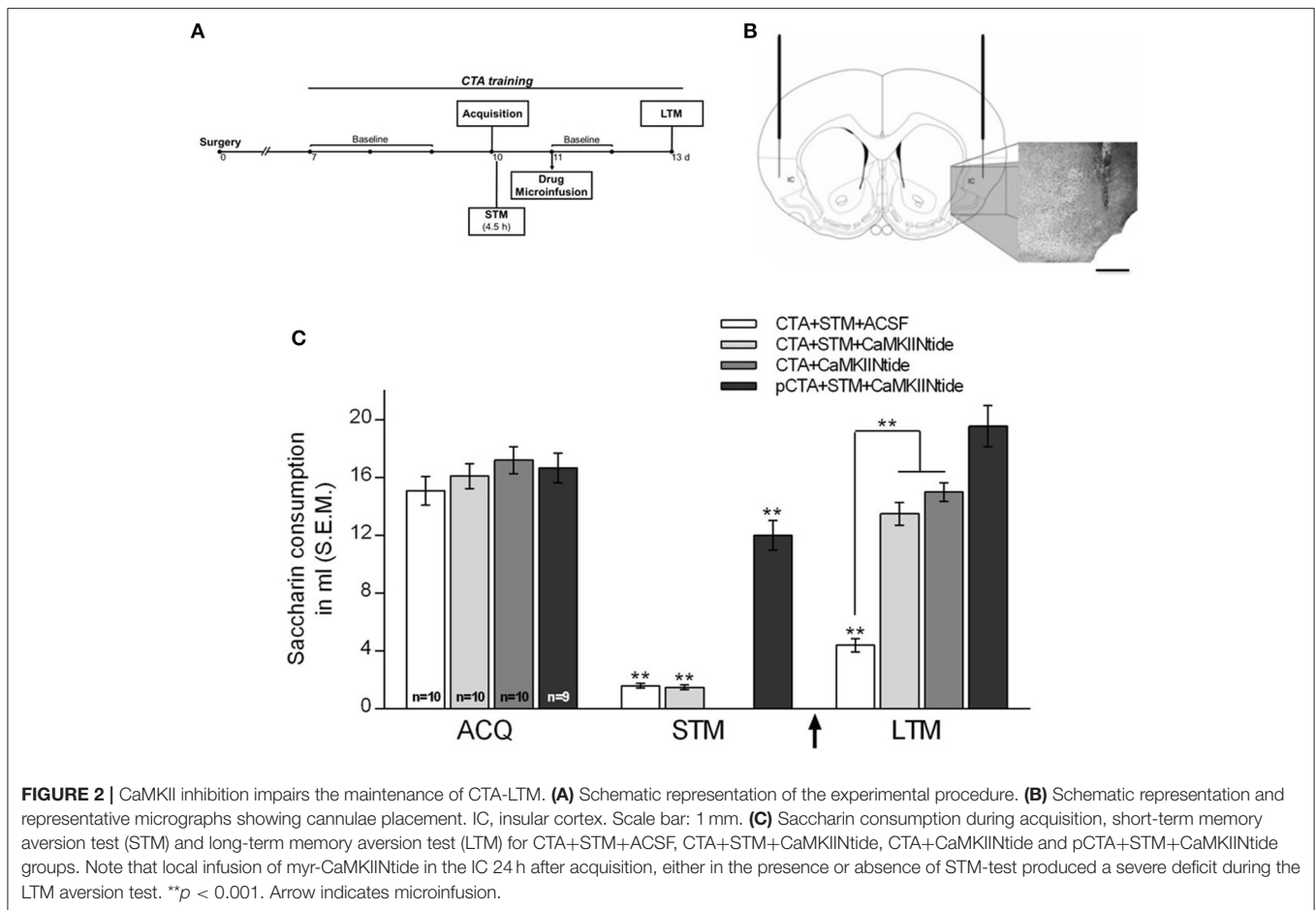


pCTA+STM+CaMKIINtide groups ($p < 0.001$). During the STM aversion test groups CTA+STM+VEH and CTA+STM+CaMKIINtide showed a significant reduction in the consumption of saccharin solution, confirming that the association with the gastric malaise was well established, as shown in **Figure 2C**.

DISCUSSION

Relatively little is known about the LTP maintenance processes that underlie the persistence of synaptic memory. The results of the present study demonstrate that CaMKII is necessary for the maintenance of *in vivo* HFS induced potentiation of synaptic transmission at Bla-IC pathway, considered as an

important excitatory circuit implicated in the acquisition and storage of CTA. The intracortical application of the CaMKII inhibitor, myr-CaMKIINtide, 2 h after HFS delivery suppressed the maintenance phase of synaptic potentiation. The suppression can most likely be attributed to a decrease in the CaMKII phosphorylation, as confirmed by the immunoblot analysis. Remarkably, the application of the inhibitor in the absence of HFS did not have any effect over baseline transmission. Previous studies have revealed an important potential role for CaMKII in memory maintenance but most have been performed in the hippocampus. In this regard, Sanhueza and colleagues, have reported that application of an inhibitor of CaMKII lead to the decrement of synaptic potentiation during the maintenance phase of *in vitro* N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors dependent LTP in CA1 region (Sanhueza et al., 2007, 2011),



and recently our research group has observed similar results in the hippocampal MF pathway *in vivo* (Juárez-Muñoz et al., 2017).

Regarding the mechanisms, it has been described that autophosphorylation of CaMKII generates autonomous activity, as well as post-synaptic translocation to interact with target proteins, such as α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) and NMDA receptors (Strack and Colbran, 1998; Baucum et al., 2015). Indeed, the absence of T286 CaMKII autophosphorylation blocks the hippocampal NMDA dependent LTP (Giese et al., 1998; Yamagata et al., 2009). In addition, it has been well established that autonomous CaMKII phosphorylates AMPA receptors, an event that accounts for LTP induction (Derkach et al., 1999; Ghosh et al., 2015). On the other hand, it has been proposed that the association of CaMKII with GluN2B subunits of NMDA receptors is a central mechanism required for the maintenance phase of LTP in the hippocampus (Sanhueza et al., 2011). CaMKII-GluN2B binding persists even after LTP stimulus decay and this association leaves the kinase in a partially autonomous conformation that mediates its redistribution (Strack et al., 2000; Bayer et al., 2006; O’Leary et al., 2011). Accumulation of CaMKII-GluN2B at the post-synaptic density promotes the capture of multiple proteins including actinin, densin, delta-catenin and N-cadherin, acting

as a structural scaffold for a series of binding reactions that together contribute to LTP maintenance (Sanhueza and Lisman, 2013). Moreover, it is known that structural reorganization as a result of activity is required for maintenance of synaptic strength (Lamprecht and LeDoux, 2004; Lynch et al., 2007). In this regard, it has been demonstrated that CaMKII inhibition during the maintenance phase of MF-LTP prevents the activity-dependent morphological reorganization in this pathway (Juárez-Muñoz et al., 2017). In addition, several studies have demonstrated the interaction of CaMKII with actin polymerization (Fink et al., 2003; Kim et al., 2015), as well as with enzymes of the Rho/Rac family controlling spine dynamics, turnover and morphology (Murakoshi et al., 2011).

It is well established that the Bla-IC pathway contributes to the formation and retention of CTA memory (Escobar and Bermúdez-Rattoni, 2000; Rodríguez-Durán et al., 2011, 2017; Rodríguez-Durán and Escobar, 2014). CTA and IC-LTP share similar molecular mechanisms, such as NMDA receptor dependence (Escobar et al., 1998a, 2002; Rodríguez-Durán and Escobar, 2014), activation of extracellular signal-regulated kinase-1/2 (ERK1/2), immediately-early gene expression (Jones et al., 1999), and protein synthesis dependence (Moguel-González et al., 2008; Rodríguez-Durán et al., 2011). However, the identity of the actors involved in CTA-LTM maintenance remains

largely unknown. Our present findings reveal that CaMKII is a relevant actor for the maintenance of CTA-LTM, since intracortical microinfusion of myr-CaMKIINtide 24 h after CTA acquisition lead to memory impairment during LTM aversion test, performed 72 h after CTA acquisition. Importantly, the effect of CaMKII inhibition on CTA-LTM was specific to CS-US association, since the memory deficit was not present when rats were pseudotrained in CTA.

In this line of ideas, it has been shown that training rats in the Morris water maze positively correlates with an increase in hippocampal CaMKII autonomous activity (Tan and Liang, 1996). In addition, learning of a step-down inhibitory avoidance task increases hippocampal CaMKII activity (Cammarota et al., 1998). Recently, it has been found that expression of a dominant-negative form of CaMKII lead to a strong reduction in spatial memory of mice that persisted even after this form was no longer expressed (Rossetti et al., 2017). In the case of IC, it has been shown that exposure to a novel taste lead to an increase in CaMKII autophosphorylation for up to 3 h after taste consumption. In addition, application of a selective CaMKII inhibitor in the IC 25 min after saccharine consumption attenuated CTA memory tested 3 or 5 h after the establishment of the association (Adaikkan and Rosenblum, 2015). On the other hand, studies involving genetic disruption of CaMKII activity have shown that homozygous α CaMKII mutant mice present deficits in spatial learning (Silva et al., 1992), however they can be overcome with extended training (Elgersma et al., 2002). This compensation cannot be found in mice with a threonine-to-alanine point mutation of CaMKII, preventing the autophosphorylation of the kinase (Giese et al., 1998; Need and Giese, 2003). Moreover, CaMKII autophosphorylation-deficient mutant mice exhibit impaired *de novo* gene transcription required for contextual fear memory consolidation (von Herten and Giese, 2005). In a pioneer study Frankland and colleagues, demonstrated that while mice heterozygous for a CaMKII null

mutation have normal memory retention for contextual fear and water maze tasks 1–3 days after training, these animals were amnesic when tested 10–50 days post-training, suggesting a role for CaMKII not only in consolidation but also in the maintenance of memory (Frankland et al., 2001). Since the association between CaMKII and GluN2B has been proposed as a substrate for memory maintenance, mice with a mutation that prevents the formation of the CaMKII/GluN2B complex show memory impairment in the Morris water maze when tested at 1 or 3 days after the last training session (Halt et al., 2012).

In summary, our present results show that CaMKII inhibition in the IC during the late-phase of *in vivo* LTP of the Bla-IC projection, described as a necessary pathway for acquisition and storage of CTA memory, blocks the potentiation maintenance. In the same manner, inhibition of CaMKII in the IC 24 h after CTA acquisition impairs the CTA memory persistence. Together these results indicate that CaMKII is a central key component for the maintenance of neocortical synaptic plasticity as well as for persistence of CTA-LTM.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

YJ-M: Acquisition, analysis, and interpretation of data; drafting the article and revising it critically for important intellectual content. LR-L: Acquisition, analysis, and interpretation of data. ME: Conception and design; analysis and interpretation of data, drafting the article and revising it critically for important intellectual content.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by PAPIIT IN215816 and CONACYT 367853 and 474. We thank Esteban Urrieta Chávez for careful reading of the article.

REFERENCES

- Adaikkan, C., and Rosenblum, K. (2015). A molecular mechanism underlying gustatory memory trace for an association in the insular cortex. *Elife* 4:e07582. doi: 10.7554/eLife.07582
- Ahmed, T., and Frey, J. U. (2005). Plasticity-specific phosphorylation of CaMKII, MAP-kinases and CREB during late-LTP in rat hippocampal slices *in vitro*. *Neuropharmacology* 49, 477–492. doi: 10.1016/j.neuropharm.2005.04.018
- Babcock, A. M., Standing, D., Bullshields, K., Schwartz, E., Paden, C. M., and Poulsen, D. J. (2005). Inhibition of hippocampal Ca/Calmodulin-dependent protein kinase II by RNA interference. *Mol. Ther.* 11, 899–905. doi: 10.1016/j.yth.2005.02.016
- Baucum, A. J. II, Shonesy, B. C., Rose, K. L., and Colbran, R. J. (2015). Quantitative proteomics analysis of CaMKII phosphorylation and the CaMKII interactome in the mouse forebrain. *ACS Chem. Neurosci.* 6, 615–631. doi: 10.1021/cn500337u
- Bayer, K. U., LeBel, E., McDonald, G. L., O'Leary, H., Schulman, H., and De Koninck, P. (2006). Transition from reversible to persistent binding of CaMKII to postsynaptic sites and NR2B. *J. Neurosci.* 26, 1164–1174. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3116-05.2006
- Bermúdez-Rattoni, F. (2014). The forgotten insular cortex. *Neurobiol. Lear. Mem.* 109, 207–216. doi: 10.1016/j.nlm.2014.01.001
- Bernstein, I. L., and Koh, M. T. (2007). Molecular signaling during taste aversion learning. *Chem. Senses* 32, 99–103. doi: 10.1093/chemse/jj032
- Cammarota, M., Bernabeu, R., Levi De Stein, M., Izquierdo, I., and 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. doi: 10.1046/j.1460-9568.1998.00254.x
- Castillo, D. V., and Escobar, M. L. (2011). A role for MAPK and PI-3K signaling pathways in brain-derived neurotrophic factor modification of conditioned taste aversion retention. *Behav. Brain Res.* 217, 248–252. doi: 10.1016/j.bbr.2010.10.013
- Castillo, D. V., Figueroa-Guzmán, Y., and Escobar, M. L. (2006). Brain derived neurotrophic factor enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Res.* 1067, 250–255. doi: 10.1016/j.brainres.2005.10.085
- Colbran, R. J., and Brown, A. M. (2004). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and synaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 318–327. doi: 10.1016/j.conb.2004.05.008
- Cooke, S. F., and Bear, M. F. (2010). Visual experience induces long-term potentiation in the primary visual cortex. *J. Neurosci.* 30, 16304–16313. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4333-10.2010

- Derkach, V., Barria, A., and Soderling, T. R. (1999). Ca^{2+} /calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 3269–3274. doi: 10.1073/pnas.96.6.3269
- Elgersma, Y., Fedorov, N. B., Ikonen, S., Choi, E. S., Elgersma, M., Carvalho, O. M., et al. (2002). Inhibitory autophosphorylation of CaMKII controls PSD association, plasticity, and learning. *Neuron* 36, 493–505. doi: 10.1016/S0896-6273(02)01007-3
- Escobar, M. L., Alcocer, I., and Bermúdez-Rattoni, F. (2002). *In vivo* effects of intracortical administration of NMDA and metabotropic glutamate receptors antagonists on neocortical long-term potentiation and conditioned taste aversion. *Behav. Brain Res.* 129, 101–106. doi: 10.1016/S0166-4328(01)00329-1
- Escobar, M. L., Alcocer, I., and Chao, V. (1998b). The NMDA receptor antagonist CPP impairs conditioned taste aversion and insular cortex long term potentiation *in vivo*. *Brain Res.* 812, 246–251. doi: 10.1016/S0006-8993(98)00931-7
- Escobar, M. L., and Bermúdez-Rattoni, F. (2000). Long term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Res.* 852, 208–212. doi: 10.1016/S0006-8993(99)02134-4
- Escobar, M. L., Chao, V., and Bermúdez-Rattoni, F. (1998a). *In vivo* long-term potentiation in the insular cortex: NMDA receptor dependence. *Brain Res.* 779, 314–319. doi: 10.1016/S0006-8993(97)01175-X
- Fink, C. C., Bayer, K. U., Myers, J. W., Ferrell, J. E. Jr., Schulman, H., and Meyer, T. (2003). Selective regulation of neurite extension and synapse formation by the β but not the α isoform of CaMKII. *Neuron* 39, 283–297. doi: 10.1016/S0896-6273(03)00428-8
- Frankland, P. W., O'Brien, C., Ohno, M., Kirkwood, A., and Silva, A. J. (2001). Alpha-CaMKII-dependent plasticity in the cortex is required for permanent memory. *Nature* 411, 309–313. doi: 10.1038/35077089
- Ghosh, S., Reuveni, I., Barkai, E., and Lamprecht, R. (2015). CaMKII activity is required for maintaining learning-induced enhancement of AMPAR-mediated synaptic excitation. *J. Neurochem.* 136, 1168–1176. doi: 10.1111/jnc.13505
- Giese, K. P., Fedorov, N. B., Filipkowski, R. K., and Silva, A. J. (1998). Autophosphorylation at Thr286 of the alpha calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning. *Science* 279, 870–873. doi: 10.1126/science.279.5352.870
- Halt, A. R., Dallapiazza, R. F., Zhou, Y., Steins, I. S., Qian, S. J., Wojcik, S., et al. (2012). CaMKII binding to GluN2b is critical during memory consolidation. *EMBO J.* 31, 1203–1216. doi: 10.1038/emboj.2011.482
- Jones, M. W., French, P. J., Bliss, T. V., and Rosenblum, K. (1999). Molecular mechanism of long term potentiation in the insular cortex *in vivo*. *J. Neurosci.* 123, 844–850.
- Juárez-Muñoz, Y., Rivera-Olvera, A., Ramos-Languren, L. E., and Escobar, M. L. (2017). CaMKII requirement for the persistence of *in vivo* hippocampal mossy fiber synaptic plasticity and structural reorganization. *Neurobiol. Learn. Mem.* 139, 56–62. doi: 10.1016/j.nlm.2016.12.015
- Kim, K., Lakhanpal, G., Lu, H. E., Khan, M., Suzuki, A., Hayashi, M. K., et al. (2015). A Temporary gating of actin remodeling during synaptic plasticity consists of the interplay between the kinase and structural functions of CaMKII. *Neuron* 87, 813–826. doi: 10.1016/j.neuron.2015.07.023
- Lamprecht, R., and LeDoux, J. (2004). Structural plasticity and memory. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 45–54. doi: 10.1038/nrn1301
- Lengyel, I., Voss, K., Cammarota, M., Bradshaw, K., Brent, V., Murphy, K. P., et al. (2004). Autonomous activity of CaMKII is only transiently increased following the induction of long-term potentiation in the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 20, 3063–3072. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03748.x
- Lisman, J., Schulman, H., and Cline, H. (2002). The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 175–190. doi: 10.1038/nrn753
- Lisman, J., Yasuda, R., and Raghavachari, S. (2012). Mechanisms of CaMKII action in long term potentiation. *Nat. Rev.* 13, 169–182. doi: 10.1038/nrn3192
- Liu, Y. Z., Wang, Y., Shen, W., and Wang, Z. (2017). Enhancement of synchronized activity between hippocampal CA1 neurons during initial storage of associative fear memory. *J. Physiol.* 595, 5003–5400. doi: 10.1113/JP274212
- Lynch, G., Rex, C. S., and Gall, C. M. (2007). LTP consolidation: substrates, explanatory power, and functional significance. *Neuropharmacology* 52, 12–23. doi: 10.1016/j.neuropharm.2006.07.027
- Malenka, R. C., and Bear, M. F. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44, 5–21. doi: 10.1016/j.neuron.2004.09.012
- Martínez-Moreno, A., Rodríguez-Durán, L. F., and Escobar, M. L. (2016). Brain-derived neurotrophic factor into adult neocortex strengthens a taste aversion memory. *Behav. Brain Res.* 297, 1–4. doi: 10.1016/j.bbr.2015.09.034
- Moguel-González, M. G., Gómez-Palacio-Schjetnan, A., and Escobar, M. L. (2008). BDNF reserves the CTA memory deficits produced by inhibition of protein synthesis. *Neurobiol. Learn. Mem.* 90, 584–587. doi: 10.1016/j.nlm.2008.06.003
- Murakoshi, H., Shin, M. E., Parra-Bueno, P., Szatmari, E. M., Shibata, A. C. E., and Yasuda, R. (2017). Kinetics of endogenous CaMKII required for synaptic plasticity revealed by optogenetic kinase inhibitor. *Neuron* 94, 690. doi: 10.1016/j.neuron.2017.04.027
- Murakoshi, H., Wang, H., and Yasuda, R. (2011). Local, persistent activation of Rho GTPases during plasticity of single dendritic spines. *Nature* 472, 100–104. doi: 10.1038/nature09823
- Nader, K., and Einarsson, E. O. (2010). Memory reconsolidation: an update. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1191, 27–41. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05443.x
- Need, A. C., and Giese, K. P. (2003). Handling and environmental enrichment do not rescue learning and memory impairments in alphaCamKII(T286A) mutant mice. *Genes Brain Behav.* 2, 132–139. doi: 10.1034/j.1601-183X.2003.00020.x
- O'Leary, H., Liu, W. H., Rorabaugh, J. M., Coultrap, S. J., and Bayer, K. U. (2011). Nucleotides and phosphorylation bi-directionally modulate Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) binding to the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunit GluN2B. *J. Biol. Chem.* 286, 31272–31281. doi: 10.1074/jbc.M111.233668
- Otmakhov, N., Regmi, S., and Lisman, J. E. (2015). Fast decay of CaMKII FRET sensor signal in spines after LTP induction is not due to its dephosphorylation. *PLoS ONE* 10:e0130457. doi: 10.1371/journal.pone.0130457
- Rioutl-Pedotti, M. S., Friedman, D., and Donoghue, J. P. (2000). Learning-induced LTP in neocortex. *Science* 290, 533–536. doi: 10.1126/science.290.5491.533
- Rivera-Olvera, A., Rodríguez-Durán, L. F., and Escobar, M. L. (2016). Conditioned taste aversion prevents the long-lasting BDNF-induced enhancement of synaptic transmission in the insular cortex: a metaplastic effect. *Neurobiol. Learn. Mem.* 130, 71–76. doi: 10.1016/j.nlm.2016.01.014
- Rodríguez-Durán, L. F., Castillo, D. V., Moguel-González, M., and Escobar, M. L. (2011). Conditioned taste aversion modifies persistently the subsequent induction of neocortical long-term potentiation *in vivo*. *Neurobiol. Learn. Mem.* 95, 519–526. doi: 10.1016/j.nlm.2011.03.003
- Rodríguez-Durán, L. F., and Escobar, M. L. (2014). NMDA receptor activation and PKC but not PKA lead to the modification of the long-term potentiation in the insular cortex induced by conditioned taste aversion: differential role of kinases in metaplasticity. *Behav. Brain Res.* 266, 58–62. doi: 10.1016/j.bbr.2014.02.049
- Rodríguez-Durán, L. F., Martínez-Moreno, A., and Escobar, M. L. (2017). Bidirectional modulation of taste aversion extinction by insular cortex LTP and LTD. *Neurobiol. Learn. Mem.* 142(Pt A), 85–90. doi: 10.1016/j.nlm.2016.12.014
- Rodríguez-Serrano, L. M., Ramírez-León, B., Rodríguez-Durán, L. F., and Escobar, M. L. (2014). Acute infusion of brain-derived neurotrophic factor in the insular cortex promotes conditioned taste aversion extinction. *Neurobiol. Learn. Mem.* 116, 139–144. doi: 10.1016/j.nlm.2014.10.007
- Rossetti, T., Banerjee, S., Kim, C., Leubner, M., Lamar, C., Gupta, P., et al. (2017). Memory erasure experiments indicate a critical role of CaMKII in memory storage. *Neuron* 96, 207–216. doi: 10.1016/j.neuron.2017.09.010
- Sanhueza, M., Fernández-Villalobos, G., Stein, I. S., Kasumova, G., Zhang, P., Bayer, K. U., et al. (2011). Role of the CaMKII/NMDAR complex in the maintenance of synaptic strength. *J. Neurosci.* 31, 9170–9178. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1250-11.2011
- Sanhueza, M., and Lisman, J. (2013). CaMKII/NMDAR complex as a molecular memory. *Mol. Brain.* 6:10. doi: 10.1186/1756-6606-6-10
- Sanhueza, M., McIntyre, C. C., and Lisman, J. E. (2007). Reversal of synaptic memory by Ca/Calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor. *J. Neurosci.* 19, 5190–5199. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5049-06.2007
- Silva, A. J., Stevens, C. F., Tonegawa, S., and Wang, Y. (1992). Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* 5067, 201–206. doi: 10.1126/science.1378648
- Strack, S., and Colbran, R. J. (1998). Autophosphorylation-dependent targeting of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II by the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J. Biol. Chem.* 273, 20689–20692. doi: 10.1074/jbc.273.33.20689
- Strack, S., McNeil, R. B., and Colbran, R. J. (2000). Autophosphorylation-dependent targeting of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II by

- the NR2B subunit of the N-Methyl- D -aspartate receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 23798–23806. doi: 10.1074/jbc.M001471200
- Tan, S. E., and Liang, K. C. (1996). Spatial learning alters hippocampal calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity in rats. *Brain Res.* 711, 234–240. doi: 10.1016/0006-8993(95)01411-X
- von Hertzen, L. S., and Giese, K. P. (2005). Alpha-isoform of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II autophosphorylation is required for memory consolidation-specific transcription. *Neuroreport* 16, 1411–1414. doi: 10.1097/01.wnr.0000175244.51084.bb
- Whitlock, J. R., Heynen, A. J., Shuler, M. G., and Bear, M. F. (2006). Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 313, 1093–1097. doi: 10.1126/science.1128134
- Yamagata, Y., Kobayashi, S., Umeda, T., Inoue, A., Sakagami, H., Fukaya, M., et al. (2009). Kinase-dead knock-in mouse reveals an essential role of kinase activity of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II alpha in dendritic spine enlargement, long-term potentiation, and learning. *J. Neurosci.* 29, 7607–7618. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0707-09.2009
- Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Juárez-Muñoz, Ramos-Languren and Escobar. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.