



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

# **“Regulación de la vía de ERK durante la reconsolidación de una memoria aversiva en ratones”.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en  
el área de Biología Molecular.

**Lic. Santiago Ojea Ramos**

Directora de tesis: Dra. Mariana Feld.

Director Adjunto: Dr. Mariano Boccia.

Consejero de Estudios: Dr. Arturo Romano.

Lugar de trabajo: Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE – UBA - CONICET).

Buenos Aires, 2024

## Resumen.

En el presente trabajo se pretende abordar el estudio de mecanismos de regulación de la reconsolidación de la memoria. Para ello utilizamos la tarea de evitación inhibitoria, la cual constituye un modelo de estudio de procesos de aprendizaje y memoria ampliamente utilizados en el campo de las neurociencias. Esta tesis se enmarca en el estudio de mecanismos de regulación de la vía de señalización de ERK/MAPK en el hipocampo de ratones CF-1 luego de la reactivación de la memoria de evitación inhibitoria. Asimismo, hemos extendido el estudio a otras áreas cerebrales involucradas en la reconsolidación de esta memoria.

En particular, estudiamos el rol de la dimerización de la proteína ERK2 en los procesos que ocurren luego de la reactivación de la memoria. Para esto, entrenamos ratones de la cepa CF-1 con dos tipos de entrenamiento: uno de intensidad débil y otro de intensidad fuerte, y 48 horas después reactivamos la memoria. Encontramos que la dimerización de ERK2 en el hipocampo depende del tipo de entrenamiento usado. Más aún, estudiamos el efecto de la administración de un inhibidor de la dimerización luego de la reactivación de la memoria en el hipocampo, y observamos que su efecto también depende del tipo de entrenamiento usado: mientras que en los animales entrenados con un shock fuerte la droga causó un impedimento en la tarea conductual, en los animales entrenados con un shock débil tuvo un efecto facilitador.

Por otro lado, estudiamos una proteína reguladora de la actividad ERK en el compartimento citosólico: la fosfatasa MKP3, que regula su defosforilación. Encontramos que la expresión de esta proteína sigue, una cinética inversa respecto de la fosforilación de ERK. Además, pusimos a punto la administración de BCI, una droga que impide la actividad de MKP3, por lo que para futuros estudios contamos con una herramienta farmacológica que regula positivamente la actividad de ERK de manera específica, algo con lo que no contábamos hasta ahora.

Por último, realizamos estudios de inmunohistoquímica contra c-Fos con el objetivo de identificar distintas áreas cerebrales involucradas en la reconsolidación de la tarea.

En resumen, en este trabajo se aportan evidencias que aportan a una mejor comprensión de los complejos mecanismos regulatorios de la vía de ERK/MAPK involucrados en los procesos de reconsolidación de la memoria de evitación inhibitoria.

**palabras claves:** memoria, reconsolidación, erk, dimerización

## Abstract.

title: Regulation of the ERK/MAPK pathway during inhibitory avoidance memory reconsolidation.

This study aims to investigate the regulatory mechanisms of memory reconsolidation. To this end, we used the inhibitory avoidance task, a widely employed model for studying learning and memory processes in neuroscience. This thesis focuses on the regulation of the ERK/MAPK signaling pathway in the hippocampus of CF-1 mice following the reactivation of inhibitory avoidance memory. Additionally, we extended the study to other brain areas involved in the reconsolidation of this memory.

Specifically, we examined the role of ERK2 protein dimerization after memory reactivation. CF-1 mice were trained with two types of training protocols: one using a weak-intensity shock and the other a strong-intensity shock, and their memory was reactivated 48 hours later. We found that ERK2 dimerization in the hippocampus depends on the type of training used. Furthermore, we studied the effects of administering an inhibitor of ERK dimerization into the hippocampus following memory reactivation. The effects were also training-dependent: in animals trained with a strong shock, the drug impaired performance in the task, whereas in animals trained with a weak shock, it had a facilitating effect.

Additionally, we studied a regulatory protein of ERK activity in the cytosolic compartment: the phosphatase MKP3, which modulates ERK dephosphorylation. We found that MKP3 expression follows an inverse kinetic pattern relative to ERK phosphorylation. Moreover, we developed an injection protocol for BCI, a drug that inhibits MKP3 activity. This provides a new pharmacological tool for future studies to positively regulate ERK activity specifically, a capability previously unavailable.

Finally, we conducted immunohistochemistry studies targeting c-Fos to identify brain areas involved in the reconsolidation of the task.

In summary, this work provides evidence contributing to a better understanding of the complex regulatory mechanisms of the ERK/MAPK pathway involved in the reconsolidation processes of inhibitory avoidance memory

**keywords:** memory, reconsolidation, erk, dimerization

# Índice

Resumen.....	1
Abstract. ....	2
Lista de Figuras.....	6
Abreviaturas.....	8
Introducción. ....	10
I1 - Aprendizaje y memoria. ....	11
I2 - Aprendizaje asociativo.....	11
I3 - La tarea de evitación inhibitoria. ....	12
I4 - Fases de la memoria. ....	13
I4.1 - Consolidación. ....	13
I4.2 - Reconsolidación. ....	14
I5 - Áreas cerebrales involucradas en memoria y aprendizaje. ....	15
I5.1 - Uso de genes de expresión temprana para identificar engramas. ....	16
I6 - Plasticidad sináptica.....	17
I7 - MAPK.....	17
I7.1 - MKPs.....	20
I7.2 - ERK en memoria. ....	22
I7.3 - ERK en IA.....	24
Objetivos e Hipótesis. ....	26
Materiales y Métodos.....	28
M1 - Sujetos experimentales. ....	29
M2 - Tarea de evitación inhibitoria.....	29
M2.1 - Aparato experimental.....	30
M2.2 - Protocolo experimental.....	30
M3 - Inyecciones intra-hipocampales.....	31
M3.1 - Determinación del sitio de inyección.....	32
M4 - Ensayos bioquímicos. ....	33
M4.1 - Obtención de extractos para determinación de dimerización de ERK2 por medio de geles nativos. ....	33
M4.2 - Determinación de dimerización por <i>western blot</i> en geles nativos.....	34

M4.3 - Obtención de extractos citosólicos para la detección de proteínas por medio de geles desnaturalizantes.....	34
M4.4 - Detección de proteínas por western blot desnaturalizante. ....	35
M4.5 - Rodajas para inmunohistoquímica.....	35
M4.6 - Inmunohistoquímica para la detección de c-Fos. ....	36
M4.7 - Adquisición y procesamiento de imágenes por microscopía confocal.....	36
M5 - Obtención de rodajas agudas para electrofisiología.....	37
M6 - Análisis estadístico.....	38
M6.1 - Datos comportamentales.....	38
M6.2 - Datos bioquímicos. ....	39
Resultados .....	40
Capítulo R1 - Dimerización de ERK.....	41
R1.1 - Dimerización <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> . ....	42
R1.2 - Dimerización de ERK2 en cultivo primario luego de un protocolo de LTP químico. ....	43
R1.3 - Efecto de inhibir la dimerización luego de un protocolo de LTP inducido por estimulación de alta frecuencia en rodajas de hipocampo de ratón. ....	44
R1.4 - Dimerización <i>in vivo</i> . ....	46
R1.5 - Dimerización de ERK2 en la reconsolidación del IA. ....	49
R1.6 - Administración de DEL luego de la reactivación de la memoria de sIA. ....	50
R1.7 - Administración de DEL luego de la re-exposición de la memoria de wIA.....	54
Capítulo R1 – Discusión .....	56
Capítulo R2 - MKP3. ....	61
R2.1 - Expresión de MKP3 luego de la reactivación de la memoria.....	63
R2.2 - Uso de BCI para inhibir la actividad de MKP3. ....	64
R2.3 - Administración de BCI después de la reactivación de sIA. ....	67
Capítulo R2 – Discusión. ....	69
Capítulo R3 - c-Fos.....	74
R3.1 - Cambios en la expresión de c-Fos luego de la reactivación de la memoria de evitación inhibitoria.....	75
R3.2 - Hipocampo. ....	76
R3.3 - Amígdala Lateral. ....	78
R3.4 - Corteza Prefrontal. ....	79
R3.5 - Corteza Retrosplenial.....	81

Capítulo R3 - Discusión.....	82
Consideraciones finales. ....	88
Rol de la dimerización de ERK2 en plasticidad y memoria. ....	89
Rol de MKP3 en memoria. ....	90
Identificación de áreas cerebrales involucradas en la reconsolidación de la memoria de evitación inhibitoria. ....	90
Anexo a R1 - Información suplementaria. ....	92
Anexo a R2 - Información suplementaria ....	98
Anexo a R3 - Información suplementaria. ....	103
Bibliografía .....	108

## Lista de Figuras

[Figura I1 | Esquema de los procesos de consolidación, estabilización y reactivación de una memoria.](#)

[Figura I2 | Vía de señalización de ERK/MAPK.](#)

[Figura I3 | Una perspectiva compleja de la señalización de ERK/MAPK.](#)

[Figura M1 | Tarea de evitación inhibitoria.](#)

[Figura M2 | Inyecciones en el hipocampo dorsal.](#)

[Figura R1.1 | Detección de dímeros de ERK2.](#)

[Figura R1.2 | La inducción de LTPq aumenta la dimerización en cultivos primarios de ratas.](#)

[Figura R1.3 | Inhibir la dimerización con DEL-22379 \(del\) impide el mantenimiento de LTP.](#)

[Figura R1.4 | DEL-22379 \(del\) inhibe la dimerización de ERK2 in vivo sin alterar su fosforilación.](#)

[Figura R1.5 | Los niveles de dimerización de ERK2 luego de la reactivación de una memoria de evitación inhibitoria dependen del tipo de entrenamiento usado.](#)

[Figura R1.6 | La administración de DEL-22379 después de la reactivación de la memoria de sIA reduce los niveles de dimerización de ERK2.](#)

[Figura R1.7 | La administración de DEL-22379 \(del\) luego de la reactivación de la memoria en animales entrenados con sIA causa un deterioro en la reconsolidación.](#)

[Figura R1.8 | La administración de DEL-22379 tiene un efecto facilitador de la memoria wIA.](#)

[Figura R2.1 | Representación esquemática de los niveles de fosforilación de ERK2 citosólica hipocampal luego de la reactivación de la memoria de IA.](#)

[Figura R2.2 | Niveles de expresión de MKP3 después de la reactivación de sIA y wIA.](#)

[Figura R2.3 | La administración de BCI no produce cambios en la expresión de MKP3 5 o 15 minutos después de su administración.](#)

[Figura R2.4 | La administración intra-hipocampal de BCI induce la fosforilación de ERK1 y ERK2.](#)

[Figura R2.5 | La administración de BCI luego de la reactivación de una memoria fuerte \(sIA\) causa un impedimento en su reconsolidación.](#)

[Figura R2.6 | Representación esquemática de los niveles de fosforilación de ERK2 y expresión de MKP3 hipocampal luego de la reactivación de la memoria de IA.](#)

[Figura R3.1 | Identificación de áreas cerebrales activadas luego de la reactivación de la memoria de evitación inhibitoria.](#)

[Figura R3.2 | Actividad inducida en el hipocampo por la reactivación de la memoria de IA.](#)

[Figura R3.3 | Actividad inducida en la amígdala lateral por la reactivación de la memoria de IA.](#)

[Figura R3.4 | Actividad inducida en la corteza prefrontal por la reactivación de la memoria de IA.](#)

[Figura R3.5 | Actividad inducida en la corteza retrosplenial por la reactivación de la memoria de IA.](#)



## Abreviaturas

**aCSF:** artificial cerebrospinal fluid

**Arc:** activity-regulated cytoskeleton-associated protein

**ARN:** ácido ribonucleico

**BCI:** BCI-215

**B-Raf:** v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1

**CA1:** cornu ammonis 1

**CA2:** cornu ammonis 2

**CA3:** cornu ammonis 3

**c-Fos:** cellular oncogene fos

**Cg:** corteza Cingulada

**CS:** conditioned stimuli

**DE:** desvío estándar

**DEL:** DEL-22379

**DG:** dentate gyrus

**DREADDs:** designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs

**DUSP:** dual specificity phosphatase

**EGF:** epidermal growth factor

**Elk1:** ETS Like-1 protein

**ERK:** extracellular regulated kinase

**Ets:** erythroblast Transformation Specific

**fEPSP:** field excitatory post synaptic potential

**FISH:** fluorescent in-situ hybridization

**Fra1:** Fos-related antigen 1

**GLM:** General Linear Model

**hfs:** high frequency stimulation

**IA:** Inhibitory Avoidance

**IEG:** Immediate Early Gene

**IL:** corteza Infralímbica

**IQR:** rango intercuartilar

**LA:** amígdala lateral

**LTP:** long term potentiation

**LTPq:** chemical long term potentiation

**MAPK:** mitogen activated protein kinase  
**MAPKK:** mitogen activated protein kinase kinase  
**MAPKKK:** mitogen activated protein kinase kinase kinase  
**MEK:** mitogen activated protein kinase kinase  
**MKP:** Mitogen-activated protein kinase phosphatase  
**MSK:** mitogen- and stress-activated kinase  
**NF-Kb:** Nuclear factor kappa B  
**NR:** no reactivado  
**PD:** PD98059  
**pERK:** erk fosforilado  
**PFC:** corteza prefrontal  
**PKA:** protein kinase A  
**PKC:** protein kinase C  
**PP1:** protein phosphatase 1  
**PP2A:** protein phosphatase 2A  
**PrL:** prelimbic cortex  
**RE:** reactivado  
**RSC:** corteza retrosplenial  
**RSK:** ribosomas S6 kinase  
**RTK:** receptor tyrosine kinase  
**sIA:** strong Inhibitory Avoidance (entrenamiento con shock fuerte)  
**tERK:** ERK total  
**TR:** entrenamiento  
**TS:** evaluación  
**US:** unconditioned stimuli  
**VEH:** vehículo  
**wIA:** weak Inhibitory Avoidance (entrenamiento con shock débil)

## Introducción

## I1 - Aprendizaje y memoria.

El aprendizaje y la memoria son funciones cognitivas que permiten a los animales relacionarse de manera efectiva con el ambiente que les rodea. Poder extraer información del contexto y de las experiencias vividas y disponer de la misma para modelar conductas futuras es de gran valor adaptativo, ya que permite contar con un repertorio conductual que mejor se adapte a las necesidades subjetivas y las exigencias de un ambiente cambiante.

Por esta razón, muchos de los mecanismos moleculares y circuitos neuronales que subyacen y regulan a estos procesos han sido conservados evolutivamente.

El concepto de aprendizaje refiere al proceso por el cual un individuo adquiere un cambio en su comportamiento producto de la experiencia<sup>1</sup>, mientras que por memoria entendemos a aquellos mecanismos que permiten que estos cambios se sostengan en el tiempo<sup>2</sup>.

## I2 - Aprendizaje asociativo.

El aprendizaje asociativo es un tipo de aprendizaje en el cual los sujetos aprenden sobre la relación entre dos estímulos, o bien entre un estímulo y una acción. Este tipo de aprendizaje es crucial para que los individuos se puedan adaptar al medio al permitirles predecir y responder a eventos basados en su experiencia previa. Probablemente el aprendizaje de este tipo más conocido es el condicionamiento clásico o Pavloviano. Este tipo de condicionamiento consiste en el aprendizaje de la asociación entre un estímulo inicialmente neutro (CS, por *conditioned stimulus*), que al presentarse de manera contingente con un estímulo capaz de evocar una respuesta (US, por *unconditioned stimulus*) genera una asociación entre ambos, dando lugar a la aparición de una respuesta condicionada. En el laboratorio, una de las formas más usadas de este tipo de aprendizaje es el caso del paradigma de condicionamiento de miedo en roedores. En esta tarea, un tono inicialmente neutro (CS) se presenta durante el entrenamiento junto a una serie de shocks eléctricos (US) en las patas de los animales que dan lugar a una respuesta incondicionada (como por ejemplo inmovilidad). Esta contingencia entre los estímulos genera que, en una posterior sesión de evaluación, cuando se CS en ausencia del US, este ahora es capaz de provocar una respuesta condicionada (de inmovilidad) por su asociación al US.

Otro tipo de aprendizaje asociativo es el condicionamiento operante o instrumental. En este caso, la asociación se da entre una conducta y sus consecuencias, que pueden aumentar (frente a consecuencias positivas) o disminuir (ante consecuencias negativas) la

probabilidad de ejecución de dicha acción en el futuro. Un ejemplo clásico de este tipo de aprendizaje son los experimentos desarrollados por Skinner<sup>3,4</sup>. Los mismos consistían en poner ratas en cajas de condicionamiento especialmente diseñadas para controlar los estímulos del medio. Los animales en un principio exploraban la caja aleatoriamente, hasta que por azar accionaban una palanca dentro de la misma. Dicha acción era recompensada en algunos experimentos (los animales recibían una porción de comida) o castigada en otros (las ratas recibían un shock eléctrico). En el primero de los casos Skinner observó que las ratas rápidamente aprendieron a accionar la palanca más rápido y con mayor frecuencia, mientras que en el segundo caso evitaban realizarlo.

### I3 - La tarea de evitación inhibitoria.

La acción de evitar estímulos dañinos es una respuesta adaptativa y natural esencial para la supervivencia de los animales. En las tareas de evitación condicionada los animales aprenden a minimizar o prevenir eventos adversos. Dentro de esta amplia descripción se pueden reconocer diversas formas de evitación condicionada en la literatura<sup>5-9</sup>, que se pueden clasificar en dos grandes categorías: tareas de evitación activa, en las cuales los animales tienen que realizar alguna acción (subir a una plataforma o accionar una palanca por ejemplo) para evitar recibir un estímulo aversivo, y tareas de evitación pasiva, en las cuales los animales aprenden a inhibir una respuesta para evitar el daño.

La tarea de evitación inhibitoria (IA, del inglés *inhibitory avoidance*) que usamos durante este trabajo es un tipo de condicionamiento que entra dentro de la categoría de evitación pasiva. Este paradigma se basa en la preferencia y búsqueda de los ratones de ambientes oscuros y poco expuestos. En la versión conocida como *step-through* que utilizamos, durante la sesión de entrenamiento se coloca al ratón en una plataforma iluminada, expuesta y elevada del suelo, que comunica con un compartimento oscuro y protegido por paredes. En esta sesión los ratones ingresan rápidamente al compartimento oscuro, donde reciben un shock eléctrico. En sesiones de evaluación posteriores, al volver a colocar al animal en la plataforma, observamos que la latencia de ingreso al comportamiento oscuro es considerablemente mayor que la observada en el día del entrenamiento (figura M1).

Este cambio de comportamiento del animal define el aprendizaje de la tarea, y el aumento de latencia de ingreso al compartimento oscuro será nuestra definición operativa de memoria.

Mowrer propone la teoría de dos factores (*two-factor theory*) para interpretar este tipo de aprendizajes<sup>10-12</sup>. Sugiere que los mismos tienen un primer factor que consiste en un aprendizaje de tipo pavloviano, en donde un estímulo condicionado (en nuestro caso, el contexto donde ocurre la tarea comportamental) se asocia a un estímulo incondicionado (el shock ecléctico), que evoca un estado emocional de valencia negativa, y el animal empleará conductas para evitar o disminuir la exposición a dicho estímulo. Una vez que se produce esta asociación, se da lugar al segundo factor en donde se refuerza la asociación entre las conductas que disminuyen el encuentro con la situación aversiva (evitando ingresar al compartimiento donde recibió el shock), reforzando la conducta por un condicionamiento de tipo operante<sup>10,13-17</sup>.

De esta manera, la tarea de evitación inhibitoria se presenta como un modelo de aprendizaje emocional en ratones y constituye una herramienta útil para el estudio de diversos aspectos relacionados a procesos de memoria y aprendizaje.

## I4 - Fases de la memoria.

El estudio de los procesos mnésicos se puede dividir en distintas etapas o fases ampliamente usadas en el campo de neurobiología de la memoria (figura I1). A continuación, se describen brevemente las más relevantes para este trabajo.

### I4.1 - Consolidación.

Luego del aprendizaje la información adquirida se encuentra codificada en los circuitos neuronales que forman la traza mnésica (o engrama) de manera frágil, necesitando que pase el tiempo para que se almacene de manera estable (figura I1).

Durante esta fase la traza mnésica es particularmente lábil y susceptible de ser interferida por diversos agentes externos, como agentes farmacológicos o estímulos distractores<sup>18-21</sup>. Una vez concluida esta fase de consolidación de la traza, la administración de estos mismos agentes deja de tener efecto, a menos que la traza vuelva a un estado lábil. Es importante destacar que el proceso de consolidación sucede en varios niveles de organización del sistema nervioso, que requieren dinámicas temporales específicas y dependen del tipo de memoria estudiada. Por ejemplo, la consolidación 'local' o celular da cuenta de los procesos de estabilización que se dan en las sinapsis y circuitos neuronales específicos que codifican una memoria<sup>22</sup>. Este tipo de consolidación dura alrededor de 6 horas luego del evento de aprendizaje<sup>23,24</sup> y en la práctica suele estar definida como la ventana

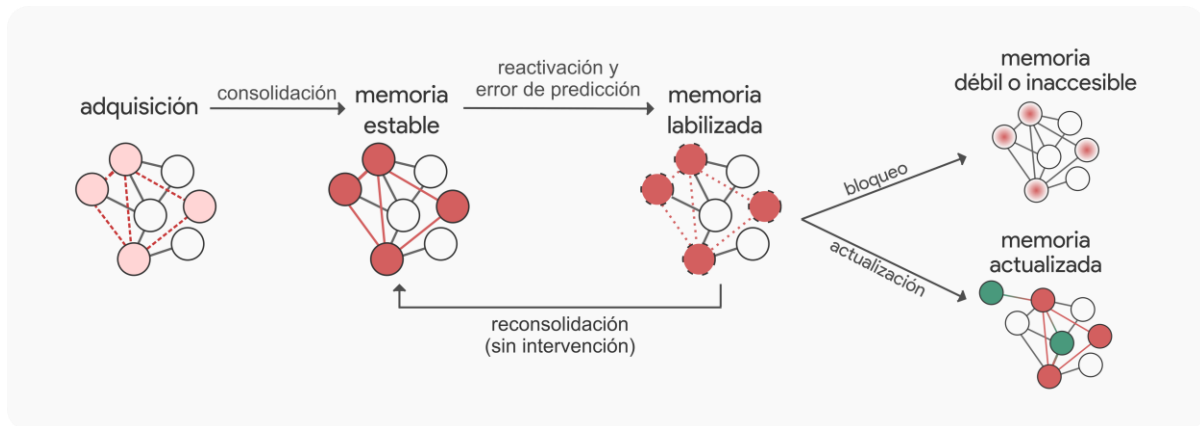
temporal durante la cual la estabilización de la memoria se puede bloquear por inhibidores de la síntesis de proteínas<sup>25</sup>, de ARN<sup>26</sup> o de otras vías moleculares (por ejemplo CREB<sup>27,28</sup>, PKA<sup>29,30</sup>, PKC<sup>31</sup>, NF-κB<sup>32,33</sup> o ERK<sup>34-37</sup> entre otras).

Por otro lado, se ha propuesto otro proceso de consolidación que puede durar días, meses o años luego de la formación de una memoria, que reorganiza y distribuye el engrama en diferentes circuitos y áreas cerebrales<sup>38-42</sup>, conocido como consolidación sistémica. Generalmente, el hipocampo es un área esencial para la adquisición y expresión temprana de memorias, pero mediante el proceso de consolidación sistémica la dependencia del hipocampo disminuye a medida que pasa el tiempo luego del aprendizaje. Este otro proceso de consolidación es responsable del mantenimiento de las memorias por largos periodos de tiempo<sup>19,40,42-44</sup>.

## 14.2 - Reconsolidación.

En el apartado anterior se definió a la consolidación como el proceso de estabilización de las memorias previamente adquiridas, pero esto no implica que una memoria consolidada se mantenga de manera estática e inalterable en el tiempo. La capacidad de actualizar las memorias adquiridas es de gran valor adaptativo, ya que permite incorporar nueva información a la traza y mantener su relevancia frente a un ambiente cambiante<sup>45</sup>. Recuperar la información almacenada no es un proceso pasivo, y múltiples trabajos en diversas especies animales han encontrado que ciertos recordatorios que dan lugar a la recuperación de una memoria pueden inducir un periodo de desestabilización de la traza mnésica consolidada, permitiendo la posibilidad de que se incorpore nueva información. Si la situación de reactivación de una memoria presenta información nueva para el animal, entonces se genera un error de predicción (es decir, una diferencia relevante entre la información almacenada originalmente y la situación actual de reactivación). Es este error de predicción lo que desencadena la labilización de la memoria<sup>46-51</sup>. Se requiere luego de un proceso de reconsolidación para la nueva estabilización de la memoria<sup>52-54</sup> ([figura 11](#)).

Este fenómeno de labilización y posterior reconsolidación de la traza mnésica ha sido observado en una gran cantidad de especies, desde *C. elegans*<sup>55</sup> hasta humanos<sup>48,56-59</sup>, incluyendo una gran cantidad de trabajos realizados en roedores<sup>60-65</sup>, permitiendo caracterizar este proceso en diversos tipos de memorias y distintos niveles de organización del sistema nervioso.



**Figura I1 | Esquema de los procesos de consolidación, estabilización y reactivación de una memoria.** Luego de la adquisición, una memoria se codifica de manera lábil, requiriendo de un proceso de consolidación para estabilizarse. Una vez estabilizada, si se reactiva y hay un error de predicción, la memoria puede volverse lábil nuevamente. Si ocurre una intervención durante este periodo, la memoria puede sufrir diferentes destinos. El bloqueo de la reconsolidación causará que la memoria se debilite o resulte inaccesible, mientras que la actualización incorporará nueva información a la traza. Por el contrario, si el proceso de reconsolidación se completa sin interferencias, la memoria se conserva o se fortalece.

## I5 - Áreas cerebrales involucradas en memoria y aprendizaje.

El aprendizaje induce cambios en los patrones de actividad de las poblaciones de neuronas activadas por la experiencia. Esta plasticidad implica una serie dinámica de cambios en la expresión génica y la conectividad sináptica, y se sostiene que son estas modificaciones las que generan cambios durables en los patrones de actividad a nivel de la población celular. Juntos, estos cambios en la expresión génica, la conectividad y la actividad conjunta de grupos de neuronas constituyen una huella de memoria neurofisiológica que se suele definir como engrama<sup>66,67</sup>. Si bien se han identificado engramas en múltiples áreas cerebrales (por ejemplo, el hipocampo<sup>68-72</sup>, la amígdala<sup>73-76</sup> o la corteza prefrontal<sup>77-79</sup>, entre otras), es generalmente aceptado que el engrama que sostiene la memoria de una experiencia específica está ampliamente distribuido en el cerebro. Los engramas en diferentes regiones del cerebro pueden dar cuenta de diferentes aspectos de la experiencia<sup>80</sup>. Por ejemplo, en la tarea de miedo condicionado contextual, los engramas hipocámpales representan principalmente el contexto de aprendizaje, mientras que en la amígdala se codifica en parte la valencia de la experiencia, y en ensambles presentes en la corteza prefrontal se codifica preferentemente información sensorial<sup>81</sup>.

Si bien la participación de distintas áreas va a depender de la tarea utilizada y la fase de la memoria estudiada, numerosos trabajos indican que el hipocampo es un área crucial para el procesamiento de memorias episódicas en distintas tareas y modelos experimentales



## 15.1 - Uso de genes de expresión temprana para identificar engramas.

Karl Lashley fue uno de los primeros investigadores en buscar el engrama usando la ablación experimental de distintas áreas del cerebro de ratas para intentar encontrar *el locus* de memorias específicas<sup>86,87</sup>. Lashley fracasó en la tarea de encontrar un engrama definido y hoy entendemos que eso se debe a la propiedad anteriormente mencionada: el ‘engrama’ de una memoria específica no es único y se encuentra distribuido en varias áreas cerebrales. Si bien los experimentos de lesión de áreas han aportado mucho al conocimiento de las estructuras involucradas en distintas fases de la memoria, las limitaciones y complicaciones en la interpretación de resultados producidos a partir de este tipo de experimentos han llevado a la búsqueda de nuevas formas de identificar engramas.

En la actualidad, uno de los métodos más usados para esta tarea consiste en la utilización de genes de expresión inmediata temprana (IEGs, del inglés *Immediate Early Gene*) como *c-Fos*, *Zif268* o *Arc* para identificar poblaciones neuronales involucradas en distintas tareas comportamentales. Estos genes son activados de manera rápida y transitoria luego de una gran variedad de estímulos, y su detección es un indicador de actividad neuronal.

Estudios en los que se somete a un ratón a una tarea conductual y luego se analiza la expresión de estos genes (o la proteína que ellos codifican) en distintas áreas cerebrales por medio de inmunohistoquímica, FISH u otras técnicas apropiadas proveen un amplio apoyo a la existencia de engramas y permiten identificar rápidamente áreas cerebrales que estarían involucradas en una determinada tarea<sup>88,89</sup>.

Cuando la marcación de engramas por IEGs se combina con otras técnicas (por ejemplo, la expresión de *channelrhodopsins* o *DREADDs* río abajo de los promotores de los IEGs), surge la posibilidad de realizar experimentos de manipulación del engrama. Mediante optogenética o quimiogenética se pueden realizar dos tipos de experimentos críticos para la definición de un engrama: estudios de pérdida de función (“*loss-of-function*”), donde selectivamente se silencian las poblaciones neuronales identificadas como parte de un engrama y se espera observar un deterioro en la memoria de los animales<sup>90</sup>, y estudios de ganancia de función (“*gain-of-function*”), en donde se induce la recuperación y la consiguiente expresión conductual de una memoria a partir de la activación artificial de engramas, en ausencia de claves naturales que induzcan su recuperación<sup>69</sup>.

## I6 - Plasticidad sináptica.

La plasticidad sináptica se entiende como la capacidad de una neurona o circuito neuronal de modificar sus propiedades en respuesta a la actividad neuronal desencadenada por una experiencia<sup>91</sup>. Una hipótesis generalmente aceptada en el estudio de la neurobiología de la memoria es que las memorias se almacenan como alteraciones en la fuerza sináptica de las conexiones entre neuronas del sistema nervioso central. Uno de los pioneros en proponer esto fue el psicólogo Donald Hebb, al formular el postulado que sostiene que *“cuando una neurona A excita a una neurona B de manera repetida y persistente, algún tipo de mecanismo metabólico o de crecimiento tiene lugar en una o ambas neuronas haciendo que la eficiencia de la neurona A para hacer que la neurona B dispare, aumente”*<sup>92</sup>. Si bien aún hay muchas preguntas sin responder sobre cómo modificaciones persistentes en la conectividad entre neuronas dan lugar a memorias y comportamientos complejos, hoy se conoce mucho más acerca de esos mecanismos fisiológicos que dan lugar a cambios en la plasticidad sináptica. A pesar de haber sido un tema de intenso debate desde los reportes originales por Bliss y Lømo<sup>93,94</sup>, hoy está ampliamente aceptado que la potenciación de largo plazo (LTP del inglés *Long Term Potentiation*) sería uno de los mecanismos fisiológicos que subyacen a la memoria y el aprendizaje revisado en 95–98.

## I7 – MAPK.

*Recientemente hemos publicado una revisión sobre el rol de ERK/MAPK en procesos mnésicos, por lo que aquí se hará una breve descripción de la vía (Ojea Ramos et al, 2022<sup>99</sup>).*

Las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK, del inglés *Extracellular Signal Regulated Kinase*) pertenecen a la familia de quinasas activadas por mitógenos (MAPK, del inglés *Mitogen Activated Protein Kinase*), conocidas por acoplar una amplia gama de señales extracelulares involucradas en diversos programas celulares como la proliferación, diferenciación y apoptosis, en múltiples especies y tejidos. En particular, ERK1 y ERK2 (ERK1/2, a menos que se aclare usaremos ‘ERK’ para referirnos a ambas isoformas y no nos estaremos refiriendo a otras quinasas de la familia como ERK3/4/5/7) fueron las primeras MAPK en ser descubiertas y, en consecuencia, de las más estudiadas en cuanto a los procesos de plasticidad cerebral, aprendizaje y memoria. Sus mecanismos de activación y funciones han sido descritos en numerosos trabajos de revisión<sup>100–104</sup>, por lo que no se describirán en detalle aquí.

Brevemente, las ERK son quinasas que se activan por señales extracelulares operando principalmente, aunque no exclusivamente, a través de un receptor de tirosina quinasa (RTKs). La vía de señalización inicia típicamente con la activación de un RTK (en el sistema nervioso son comúnmente activados por factores de crecimiento o neurotrofinas), y el siguiente paso en la cascada consiste en la activación de Ras (una superfamilia de pequeñas proteínas G). La proteína Ras desencadena subsecuentemente la activación de una cascada general de tres quinasas secuenciales: una MAPKKK de la familia Raf (principalmente Raf-1 y B-Raf en el cerebro); una MAPKK también llamada MEK (por MAPK/ERK Kinase) y por último el efector MAPK, ERK. La activación de ERK se da mediante fosforilación dual en sitios Treonina (Thr) y Tirosina (Tyr) por MEK, aunque rara vez se ha informado de activación independiente de MEK<sup>105,106</sup>. Por el contrario, la inactivación de la vía se da por defosforilación de ERK a través de tirosina-fosfatasas, Ser/Thr-fosfatasas o fosfatasas de quinasas MAP (MKPs, del inglés *MAP Kinase Phosphatases*), un subgrupo de fosfatasas de doble especificidad (DUSP, del inglés *Dual Specificity Phosphatases*), que devuelve a ERK a su estado inactivo<sup>107</sup>.

En última instancia, ERK activo puede localizarse en distintos compartimentos celulares y modular vía fosforilación la actividad de un gran número de sustratos (hay por lo menos 500 sustratos directos identificados<sup>108,109</sup>), regulando así varios procesos celulares. Este panorama se complejiza cuando consideramos que además de la gran cantidad de sustratos directos identificados, ERK es capaz de activar otras familias de quinasas como las RSKs y MSKs<sup>110</sup>, expandiendo su capacidad efectiva de regular procesos biológicos.

No hay que perder de vista que sobre esta aparentemente simple cadena de fosforilación RAS->RAF->MEK->ERK ([figura 12](#)) se montan múltiples mecanismos regulatorios, muchas veces en varios niveles de la cascada, como por ejemplo la interacción con proteínas de andamiaje, modificaciones post-traduccionales, *cross-talk* con otras vías de señalización, formas no-canónicas de activación, inactivación por fosfatasas y oligomerización entre otros, que tejen una compleja red regulatoria y no solo le confieren a la vía de ERK la capacidad de regular múltiples procesos biológicos, sino que la integración de todos estos mecanismos permiten un ajuste preciso de la señalización intracelular, pudiendo regular su localización, intensidad, duración, amplitud o frecuencia.

Cuando está inactiva, ERK se localiza principalmente en el citosol<sup>111,112</sup> (siendo retenida por MEK y otras proteínas de andamiaje) y una vez fosforilada puede formar dímeros en este compartimento y también translocar al núcleo. La relación entre la dimerización y

translocación nuclear de ERK ha sido controversial. Los primeros reportes sostenían que, frente a una estimulación, ERK podía traslocar al núcleo como monómero vía mecanismos de transporte pasivo o como dímeros por transporte activo<sup>113,114</sup>. Además, si bien Khokhlatchev et al. encontraron que mutantes deficientes para la dimerización de ERK presentaban una disminución en el ingreso al núcleo, Adachi et. al. reportaron que la dimerización no es necesaria para la translocación. Más recientemente, Burack y Shaw<sup>115</sup> encontraron que en respuesta a la estimulación se da un rápido ingreso al núcleo de ERK como monómero. En esta línea, Casar et al<sup>116</sup>, describieron que ERK se dirige al núcleo como monómero de manera independiente de la dimerización, aunque también se pueden encontrar dímeros en el compartimento nuclear, dejando abierta la pregunta sobre el rol que tienen los dímeros de ERK en este compartimento, ya que encontraron que la interacción con factores de transcripción como Elk1, Fos y Fra1 en el núcleo parece darse mediante monómeros. Aunque se ha demostrado que las MAPK ejercen su función tanto en compartimentos celulares citosólicos como nucleares, este último es probablemente el más estudiado y se han descrito varias funciones, incluyendo la regulación de la transcripción, la replicación del ADN, la remodelación de la cromatina y la síntesis de ARN <sup>revisado en 101,117–119</sup>.

Si bien la dimerización de ERK fue inicialmente descrita en 1998<sup>113</sup>, poco se sabe acerca del impacto de la misma en la señalización. La dimerización afectaría la intensidad de la señalización de ERK, ya que el dímero presenta una actividad catalítica veinte veces mayor que el monómero<sup>120</sup>. También, como se mencionó anteriormente, la dimerización regularía en parte la localización de ERK en la célula y la capacidad de interactuar con sustratos citosólicos. Esto se evidenció principalmente por la administración de DEL-22379 (DEL), una droga capaz de impedir la dimerización de ERK sin afectar su fosforilación. Se encontró que disminuir la dimerización de ERK, ya sea farmacológicamente usando DEL o por transfección de líneas celulares con mutantes defectivas para dimerización de ERK2, reduce la fosforilación de los sustratos citosólicos de ERK, mientras que aumenta la de los nucleares<sup>116,121</sup>.

En conclusión, la señalización de ERK es crucial para la regulación de múltiples procesos biológicos. Debido a este rol central, la vía de ERK ha sido intensamente estudiada por más de 30 años. Estos estudios muestran que la complejidad de la señalización mediada por ERK y la capacidad de esta vía de regular múltiples programas celulares es un reflejo de la gran cantidad de sustratos, el *cross-talk* con otras vías de señalización y los múltiples mecanismos regulatorios que actúan sobre ella. Solo una pequeña fracción de estos factores

ha sido estudiada en profundidad, por lo que se vuelve necesario estudiar en detalle estos mecanismos para tener un conocimiento más acabado del rol de ERK en procesos de plasticidad y memoria.

## 17.1 – MKPs.

Como se mencionó previamente, la actividad catalítica de ERK depende de la fosforilación dual en los sitios Tyr/Thr, por lo que la defosforilación de cualquiera de estos sitios puede inactivar a la quinasa. Esta defosforilación puede ser realizada por fosfatasas Ser/Thr (PP1 y PP2A, por ejemplo), o por *dual-specificity (Thr/Tyr) protein phosphatases* (conocidas como DUSPs, del inglés *Dual Specificity Phosphatases*). Si bien todas estas familias de fosfatasas están involucradas en la regulación de la vía, el grupo principalmente asociado a la regulación de MAPKs en mamíferos es una subfamilia de las DUSPs conocida como *dual-specificity MAPK phosphatases* (MKPs, del inglés *MAP Kinase Phosphatase*).

Las MKPs son una subfamilia de las DUSPs que se caracterizan por contar con un dominio de reconocimiento de MAPK, un sitio catalítico (dominio de fosfatasa) y secuencias que determinan su localización subcelular (se han identificado MKPs que se localizan únicamente en el citoplasma, otras exclusivamente en el núcleo, y un tercer grupo que se puede encontrar en ambas localizaciones).

Debido a su alta selectividad por MAPKs específicas y su restringida localización subcelular las MKPs tienen la capacidad de regular finamente la actividad de la cascada. De este grupo de fosfatasas, nos resulta de particular interés MKP3 (también conocida como DUSP6). MKP3 es una fosfatasa con alta selectividad por ERK, y de localización exclusivamente citosólica<sup>122,123</sup>.

Una propiedad interesante de MKP3 es que no requiere que ERK esté fosforilada para su reconocimiento y unión. Esto, a diferencia de otras fosfatasas que actúan sobre la vía de MAPK, le confiere dos mecanismos regulatorios además de la defosforilación: a) similar a MEK, MKP3 regula la localización de ERK anclándola al citoplasma<sup>124–126</sup>, y b) además de defosforilar a ERK puede regular su actividad al competir con otros sustratos, ya que cuando se encuentran unidas otros sustratos no pueden acceder la quinasa<sup>127,128</sup>. Por estas razones, la concentración de MKPs relativa a ERK y sus sustratos es un regulador determinante de la actividad de esta vía de señalización, más allá de la actividad catalítica.

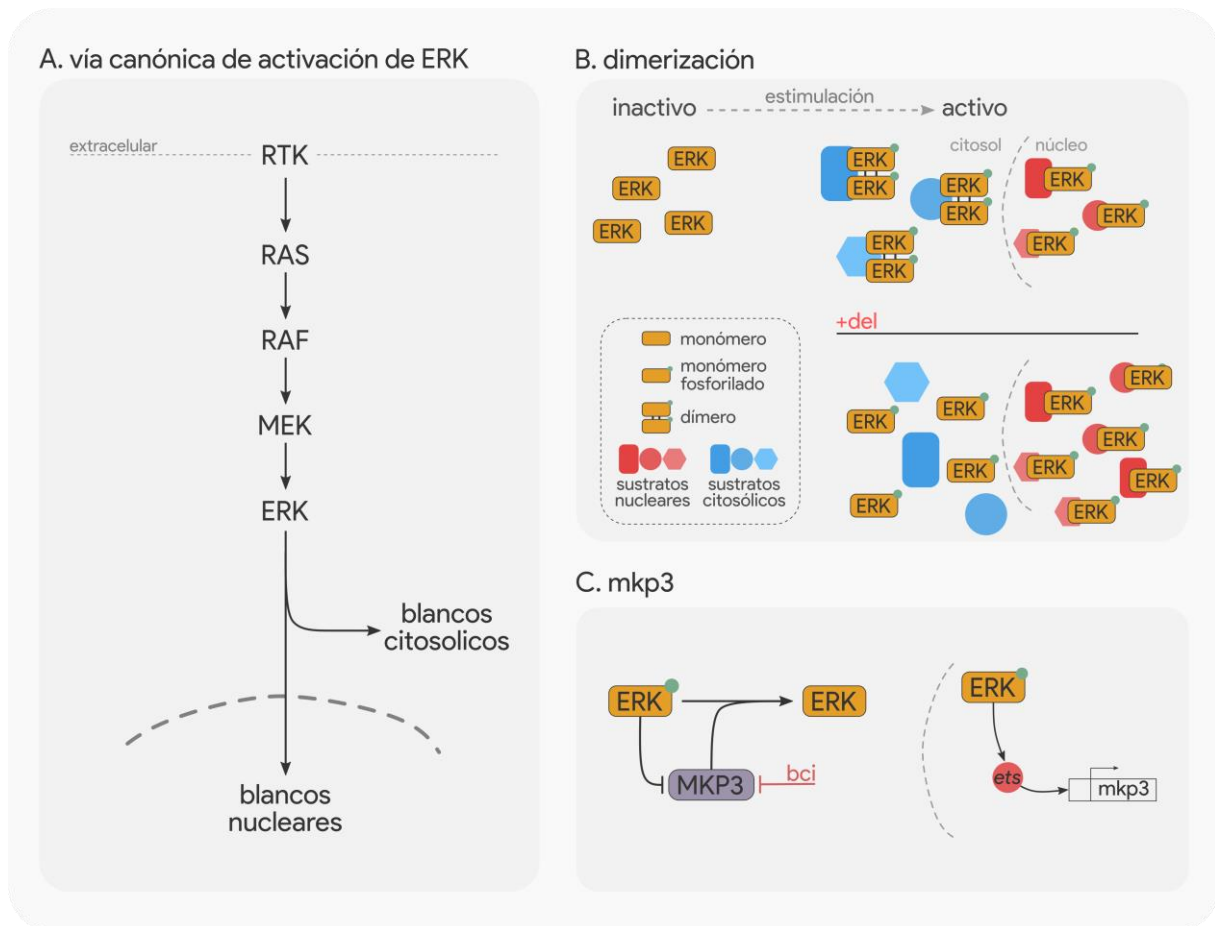
La relación entre MKP3 y ERK es compleja. La fosforilación de MKP3 en Ser159 y Ser197 por parte de ERK causa una reducción de tres veces en la vida media de la fosfatasa, resultando en un *feedback* positivo de la activación de la quinasa<sup>122,129</sup>. Por otro lado estudios

estructurales permitieron dilucidar otro mecanismo regulatorio de la actividad de MKP3: al unirse a ERK2 se da un cambio conformacional en MKP3 que resulta en un estado de alta actividad catalítica de la fosfatasa<sup>130-132</sup>.

Además, la expresión de MKP3 está regulada a nivel de su promotor por el factor de transcripción *ets*, un conocido sustrato nuclear de ERK<sup>133,134</sup>. Debido al retraso intrínseco en la expresión génica, se genera un *feedback autorregulatorio negativo*<sup>135</sup> con una dinámica temporal distinta a mecanismos más inmediatos de ‘apagado’ de la vía, tales como la desensibilización de receptores o la inhibición de reguladores río arriba *ERK-dependientes* que rápidamente frenan la señalización mediada por ERK<sup>136,137</sup>.

La actividad de MKP3 puede ser inhibida farmacológicamente usando BCI ([figura 12](#)), un inhibidor alostérico que actúa impidiendo la interacción del dominio catalítico de MKP3 con ERK, actuando como un regulador positivo de la actividad de la vía de ERK al impedir la defosforilación.

Es claro que las MKPs pueden regular la localización, intensidad y dinámica de señalización de ERK de múltiples maneras, y dado que la mayoría de las investigaciones sobre la vía de ERK se centraron en su dinámica y mecanismos de activación, es importante profundizar el estudio del rol que tienen estas fosfatasas en esta regulación.



**Figura I2 | Vía de señalización de ERK/MAPK.** A) Esquema simplificado de la vía canónica de señalización ERK/MAPK. B) Esquema del proceso de dimerización de ERK. En su estado inactivo, ERK se encuentra principalmente como monómero. Cuando la vía de señalización es estimulada, se forman homodímeros. La actividad de los dímeros está asociada principalmente a la localización citosólica, mientras que la actividad en el núcleo se asocia a monómeros. C) Regulación de la fosforilación de ERK por MKP3. En el citosol, ERK es defosforilado por MKP3, una fosfatasa de expresión exclusivamente citosólica. La actividad de MKP3 puede ser inhibida farmacológicamente usando BCI. Además, la fosforilación de MKP3 por ERK está asociada con una disminución de la vida media de esta fosfatasa. Por otra parte, ERK en el núcleo es capaz de inducir la transcripción de MKP3 mediante la fosforilación del factor de transcripción *ets*.

## 17.2 - ERK en memoria.

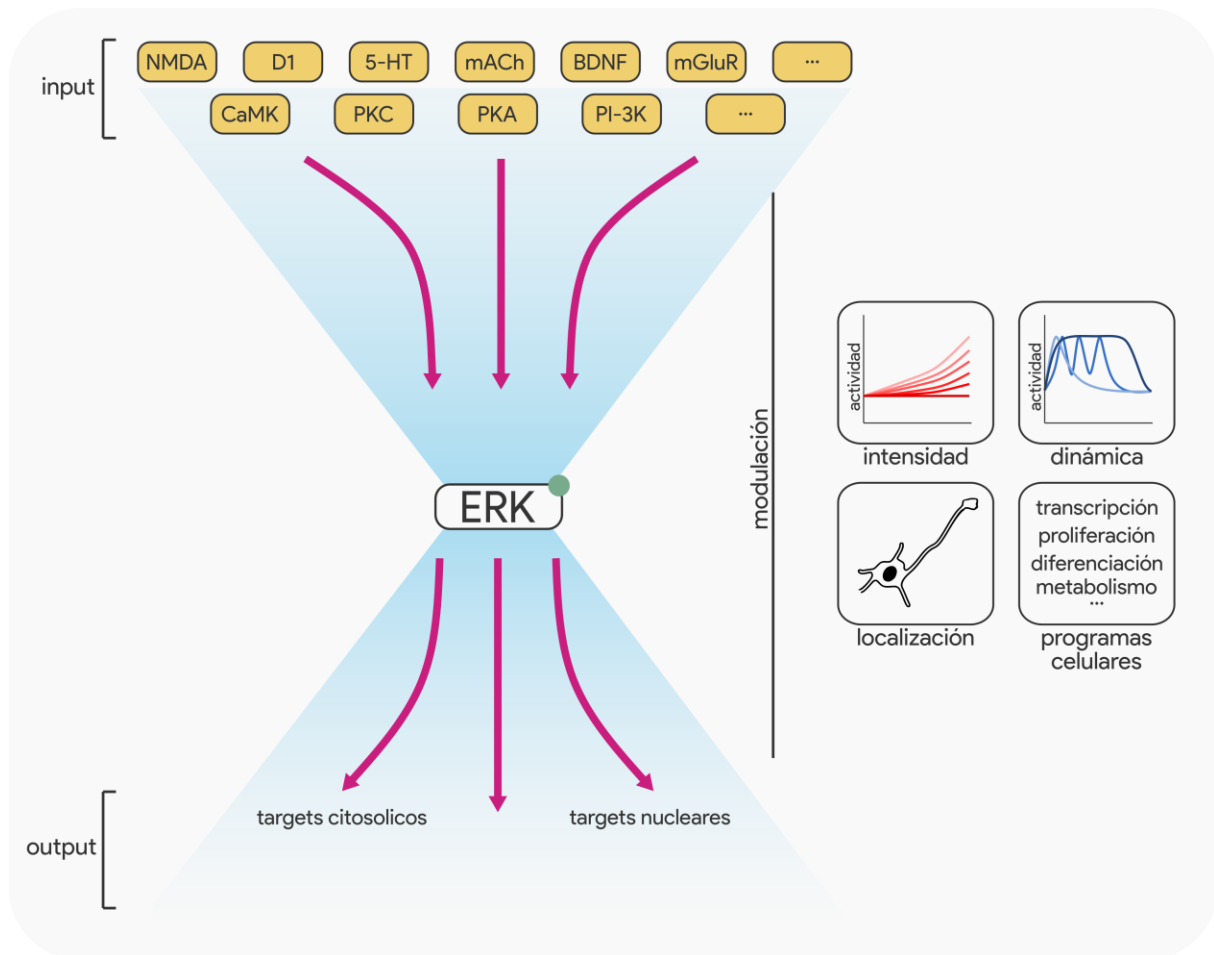
La necesidad de activación de ERK en plasticidad sináptica y memoria se ha demostrado en múltiples áreas cerebrales, tareas conductuales y modelos animales<sup>99,101,138-142</sup>. Sin embargo, la activación de ERK también se ha relacionado con la disrupción de la memoria. Ratones adultos que expresan una mutación la fosfatasa SHP2 en el hipocampo, un modelo del síndrome de Noonan, presentan un aumento de la función sináptica excitatoria basal y déficits en LTP, así como en el aprendizaje espacial. Estos déficits pueden revertirse con un inhibidor de MEK, demostrando que el aumento de la actividad basal de ERK es

responsable de los déficits de LTP y aprendizaje en este modelo <sup>143</sup>. De manera similar, hay evidencia de deterioro de la memoria de reconocimiento acompañado por una sobreactivación de ERK1 en la corteza prefrontal medial de ratones triple transgénicos (3xTg), modelo de la enfermedad de Alzheimer, que es rescatada por la inhibición local de la quinasa<sup>144</sup>. Así, en ambos modelos, el aumento excesivo de la actividad de ERK explica el déficit cognitivo, y la inhibición de la sobreactivación fue suficiente para restaurar la memoria a largo plazo. Esta evidencia da cuenta de un rol central de ERK en procesos de aprendizaje y memoria, y más aún la necesidad de una regulación correcta de la misma en cuanto a intensidad, dinámica y localización de la señalización.

Debido a su inherente complejidad, es útil pensar a la vía de señalización de ERK como una red altamente modulable con forma de embudo ([figura I3](#)), en donde los múltiples *inputs* que la activan dan lugar a una cascada de señalización que puede culminar en *outputs* muy diversos en cuanto a intensidad, duración y localización, así como procesos biológicos regulados ([figura I3](#)).

Esta configuración permite integrar la gran diversidad de resultados encontrados, ya que pone a ERK en un lugar de integrador de señales y propone un rol de articulador general de la quinasa en la regulación de procesos de memoria y plasticidad sináptica<sup>139</sup>. La cascada de ERK estaría preferentemente posicionada para este papel clave en la integración de una variedad de señales ([figura I3, inputs](#)), que son “canalizadas” hacia blancos comunes río abajo ([figura I3, outputs](#)), con el fin de lograr una respuesta coordinada y cohesiva a nivel celular.





**Figura I3 | Una perspectiva compleja de la señalización de ERK/MAPK.** Presentamos un esquema que complementa el modelo simple presentado en la figura I2. La fosforilación de ERK se presenta como nodo central, producto de la interacción de múltiples inputs posibles. A su vez, ERK fosforilado puede activar diversos outputs tanto nucleares como citosólicos. A lo largo de todo el proceso hay múltiples formas de modulación que regulan la intensidad, dinámica y localización de la actividad de señalización de ERK.

### I7.3 - ERK en IA.

Previamente se publicó una revisión sobre el rol de ERK/MAPK en la reconsolidación de la memoria de la tarea de evitación inhibitoria usada en nuestro laboratorio<sup>145</sup>, por lo que aquí se hará una breve descripción de los antecedentes más relevantes para esta tesis.

Respecto a los antecedentes relevantes sobre el rol de ERK en la tarea de evitamiento inhibitoria que usaremos en este trabajo, podemos destacar el trabajo de Krawczyk *et al.*<sup>146</sup> En este trabajo se estudiaron los niveles de fosforilación de ERK luego de la reactivación de la memoria previamente consolidada tanto en la fracción citosólica como nuclear.

Encontraron que los animales entrenados con un shock fuerte tienen un aumento de la actividad de ERK2 en la fracción citosólica 15 minutos después de la reactivación de la memoria, y una inhibición cuando se mide 45 minutos después de la reactivación.

Consistente con lo observado a nivel bioquímico, cuando se inyectó PD98059 (PD, un inhibidor de esta vía) 15 minutos después de la reactivación, observaron un deterioro de la memoria cuando es evaluada 24 horas más tarde. Resulta interesante que la reactivación de la memoria producto de un entrenamiento con un shock débil muestra una cinética de activación de ERK2 distinta. Mientras que también se ve un aumento 15 minutos después de la reactivación, cuando se mide a 45 minutos se observa un aumento significativo de la fosforilación de ERK2 en comparación con el grupo no reactivado. La administración de PD 45 minutos luego de la reactivación de esta memoria inducida por un shock débil tiene un efecto fortalecedor de la memoria, evidenciado por latencias de ingreso al compartimento oscuro similares a las inducidas por un entrenamiento con shock fuerte.

Estos resultados sugieren un rol clave de esta vía como reguladora de la fortaleza de la traza durante el proceso de reconsolidación. De manera similar, resultados de Krawczyk *et al.*<sup>146</sup> mostraron que ERK tiene gran relevancia en la re-estabilización y persistencia de esta memoria luego de la labilización que se induce por una reactivación de la traza previamente consolidada.

## Objetivos e Hipótesis

El objetivo principal de esta tesis es estudiar mecanismos regulatorios de la vía de ERK/MAPK implicados en los procesos que se desencadenan luego de la reactivación de una memoria de evitación inhibitoria en el hipocampo de ratón. Además, como segundo objetivo nos planteamos profundizar en el conocimiento de las áreas cerebrales implicadas en la reconsolidación de esta tarea.

La hipótesis central es que la reactivación de la memoria desencadena cambios en la vía de ERK/MAPK relevantes para la reconsolidación de la memoria, y por lo tanto una adecuada regulación de esta vía es esencial para la adaptación de la conducta a las situaciones que plantea el entorno.

Hipótesis específicas:

1. La dimerización de ERK2 está críticamente involucrada en el proceso de reconsolidación de la memoria.
2. La expresión de MKP3 en el hipocampo modula la actividad de la vía de ERK/MAPK siendo su actividad necesaria para la reconsolidación de la memoria de evitación inhibitoria.
3. La reactivación de la memoria induce patrones específicos de activación en diversas áreas cerebrales dependientes del tipo de entrenamiento usado.

## Materiales y Métodos

## M1 - Sujetos experimentales.

Utilizamos ratones *Mus musculus* machos pertenecientes a la cepa CF-1 provenientes del bioterio del Laboratorio de Neurofarmacología de los Procesos de Memoria (Cátedra de Farmacología, FFYB, UBA) de entre 6 y 8 semanas de edad, con un peso aproximado de 30 gramos. Para los experimentos de LTP usamos ratones de la misma cepa, de entre 30 y 40 días de edad adquiridos en el bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

Los ratones fueron albergados en jaulas metálicas (50 x 30 x 15 cm) con acceso *ad libitum* a agua y comida en un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 horas (luces encendiendo a las 8 am) y condiciones controladas de temperatura y humedad ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $55 \pm 5\%$  de humedad). Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por la CICUAL de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires (protocolo CICUAL - CUDAP # 0044975-2016, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA) y todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a lo descrito en la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio” del NIH<sup>147</sup>. A lo largo de todo el trabajo intentamos minimizar el sufrimiento y reducir el número de los animales utilizados, además de mantenerlos en condiciones apropiadas para garantizar su bienestar.

## M2 - Tarea de evitación inhibitoria.

Para este trabajo utilizamos la tarea de evitación inhibitoria (IA, del inglés *inhibitory avoidance*) en su formato *step-through*, previamente desarrollada en el laboratorio<sup>146,148</sup>. Esta tarea, que induce la formación de una memoria de largo término a partir de un único ensayo de entrenamiento, se basa en la tendencia de los ratones a evitar lugares donde se encuentren expuestos y directamente iluminados. Los sujetos deben aprender a inhibir el comportamiento de la búsqueda de un ambiente oscuro para así evitar una situación aversiva (la presentación de un shock eléctrico).

En este protocolo, los animales son colocados durante el entrenamiento en una plataforma suspendida e iluminada, que conduce a un compartimento oscuro y protegido por paredes opacas. En el día de entrenamiento los animales entran rápidamente al compartimento oscuro, donde reciben un shock eléctrico luego de ingresar con sus 4 patas. A raíz de este entrenamiento, se puede observar en sesiones de evaluación posteriores que los sujetos inhiben el comportamiento de ingreso al compartimento oscuro para así evitar recibir el shock eléctrico. El cambio en esta respuesta comportamental, producto de recordar

haber pasado por una experiencia aversiva durante el entrenamiento, se considera como la expresión de una memoria<sup>148,149</sup>.

## M2.1 - Aparato experimental.

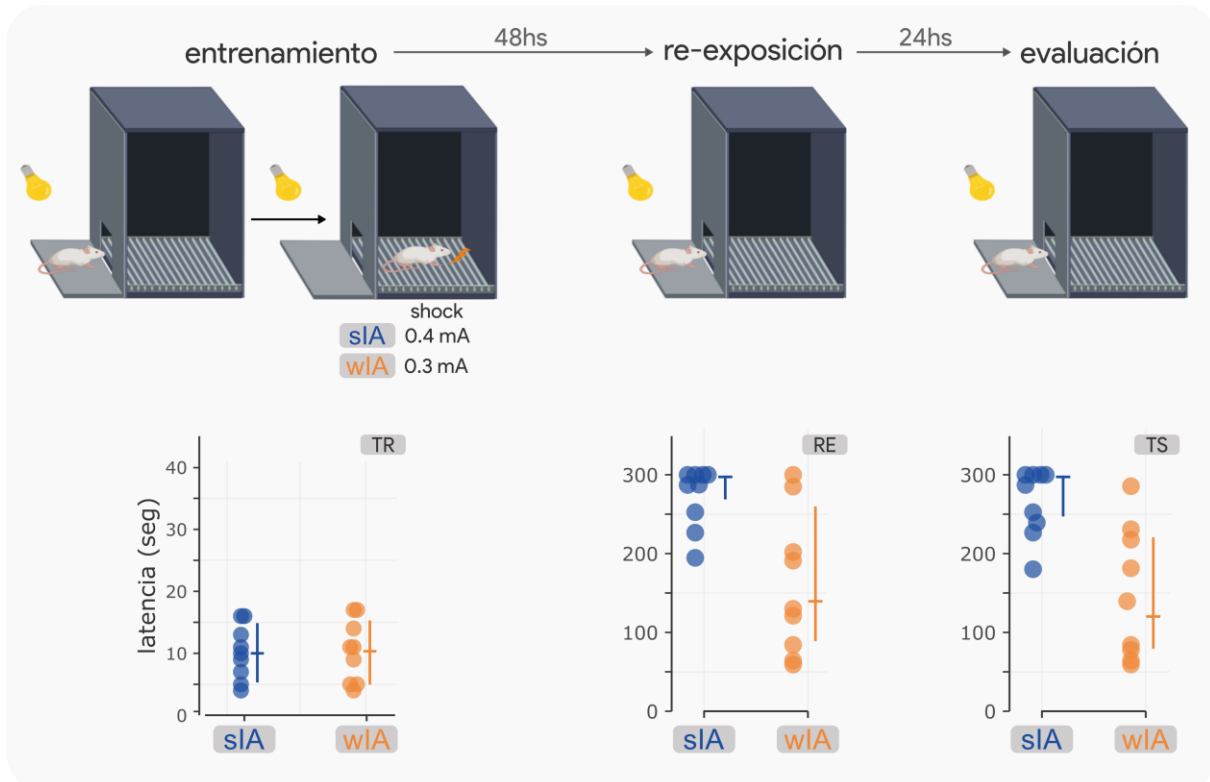
El aparato experimental consiste de un compartimento oscuro (20 x 20 x 15 cm) construido de paredes acrílico negro, que se comunica con una plataforma acrílica blanca (5 x 5 cm) sin paredes que se encuentra suspendida a 60 cm del suelo e iluminada por una lámpara de 25W.

El piso del compartimento oscuro está constituido por varillas de acero inoxidable de 4 mm de diámetro conectadas a un estimulador de corriente alterna/continua mediante el cual se puede administrar un shock eléctrico de intensidad y duración variables ([figura M1](#)).

## M2.2 - Protocolo experimental.

Durante la sesión de entrenamiento (TR), colocamos un animal en la plataforma iluminada y registramos con un cronómetro la latencia de ingreso al compartimiento oscuro. Una vez que los animales ingresan con las 4 patas, les administramos una descarga eléctrica de corriente continua de 1 segundo de duración e intensidad variable según el protocolo usado: 0,3 mA para el protocolo de estimulación débil (wIA, del inglés *weak Inhibitory Avoidance*) o 0,4 mA para el protocolo de estimulación fuerte (sIA, del inglés *strong Inhibitory Avoidance*). Una vez que termina el shock retiramos a los animales del aparato experimental y los devolvimos a su jaula. La sesión de re-exposición (RE) fue realizada cuarenta y ocho horas después del entrenamiento, y consistió en volver a colocar a los animales en la plataforma iluminada y registramos la latencia de ingreso al compartimento. Esta vez, los animales no recibieron una descarga eléctrica al ingresar. Esta sesión se da por finalizada cuando el animal ingresa al compartimiento oscuro, o bien cuando permanecen por 300 segundos en la plataforma. En este último caso, retiramos al animal de la plataforma y le asignamos una latencia de entrada de 300 segundos. Esta sesión tiene una doble función, ya que permite evidenciar la memoria producto del entrenamiento, al observarse latencias de ingreso superiores a la del día del entrenamiento, y además funciona como reactivación de la memoria original<sup>146,148,150</sup>. Veinticuatro horas después de la sesión de re-exposición realizamos la primera sesión de evaluación (TS) de manera idéntica a la re-exposición ([figura M1](#)). Esta sesión nos permite evidenciar el efecto que los distintos tratamientos realizados después de la re-exposición tienen sobre la reconsolidación de la memoria. En los experimentos incluimos además un grupo control no re-expuesto (NR). Este grupo de

animales recibió la sesión de entrenamiento, pero se mantuvo en su jaula durante la sesión de re-exposición, permitiendo controlar que el efecto de los tratamientos administrados es específico y dependiente de la reactivación de la memoria. No utilizamos ningún método estadístico para determinar el tamaño muestral, el cual fue seleccionado en base a la experiencia previa en el laboratorio.



**Figura M1 | Tarea de evitación inhibitoria.** Arriba se muestra un esquema del protocolo experimental típico. En la sesión de entrenamiento los animales son colocados en la plataforma iluminada y rápidamente ingresan al compartimento oscuro, donde reciben una descarga eléctrica (sIA para intensidad fuerte o wIA para intensidad débil). En las sesiones de re-exposición y evaluación colocamos al animal nuevamente en la plataforma iluminada y registramos la latencia de ingreso al compartimento oscuro. En estas sesiones los animales no reciben una descarga eléctrica si ingresan. Abajo se muestran las latencias típicamente asociadas a cada sesión. El día del entrenamiento los animales ingresan en torno a los 10 segundos (seg), en la re-exposición los animales entrenados con sIA expresan una mediana en torno a los 300 segundos (tiempo en el que se da por terminado la sesión y retira al animal), mientras que los wIA suelen ingresar al compartimento oscuro en torno de los 150 segundos. Si no se interfiere con la reconsolidación, los animales suelen mostrar latencias similares en una sesión de evaluación 24 horas después.

### M3 - Inyecciones intra-hipocampales.

Todas las inyecciones intra-hipocampales las realizamos de manera aguda bajo anestesia con isoflurano (Baxter). Brevemente, en el punto temporal elegido para la inyección anestesiábamos al animal con isoflurano en oxígeno (inducción: 3.5%, mantenimiento: 1%) y luego lo colocamos en un dispositivo estereotáxico (Stoelting). Higienizamos la zona con iodopovidona y realizamos una incisión con bisturí en la piel para exponer el cráneo.



Visualizamos las cisuras craneales mediante aplicación de agua oxigenada con un hisopo y realizamos dos agujeros a través de la calota (coordenadas relativas a bregma: eje antero-posterior = +1.9 mm, eje lateral =  $\pm 1.2$  mm). Una vez realizados los agujeros bajamos 2.2 mm en el eje dorso ventral (respecto a la superficie del cráneo) con la aguja de inyección (30 G). Se eligieron estas coordenadas para inyectar en el hipocampo dorsal, de acuerdo al atlas de Paxinos y Franklin<sup>151</sup>.

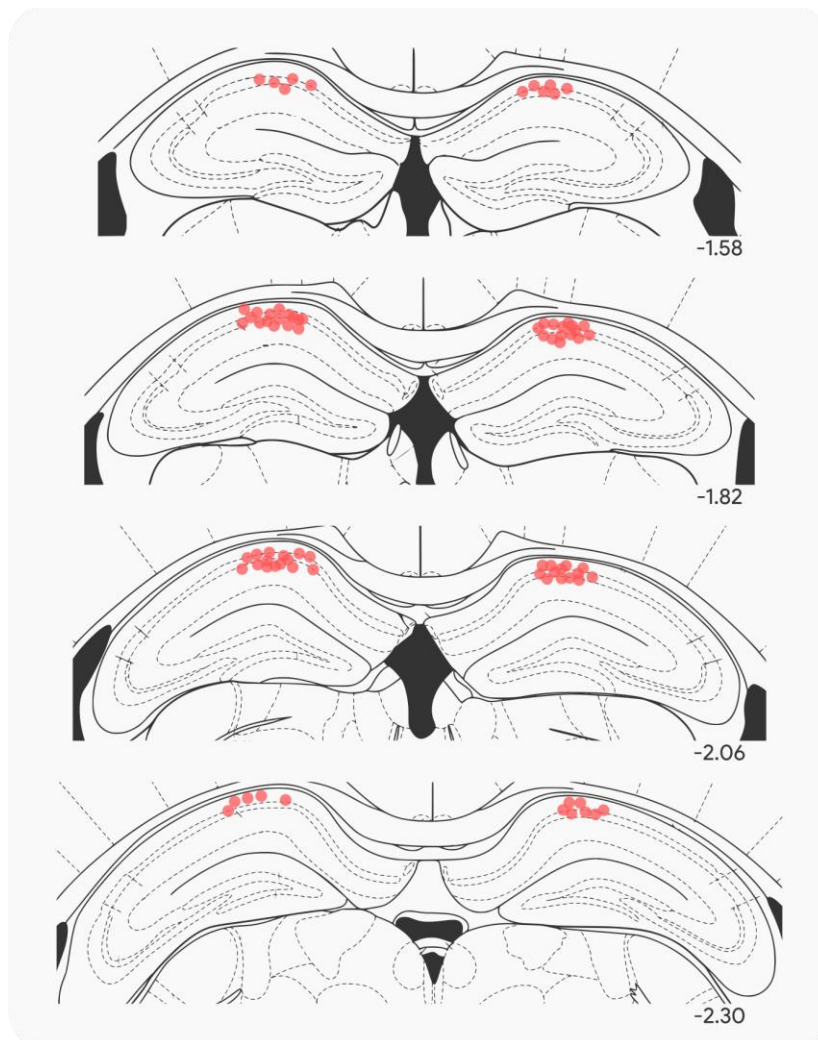
La aguja de inyección conectada a una tubuladura plástica PE-10 y a una jeringa Hamilton de 5  $\mu$ l permitió la administración de la solución con una bomba automática (MD-1020, Bioanalytical Systems Inc.) a una velocidad de 0.5  $\mu$ l/min. El volumen de solución inyectada en todos los casos fue de 0.5  $\mu$ l por hemi-hipocampo. Una vez que inyectamos el volumen deseado, dejamos la aguja durante 30 segundos en el sitio de inyección para evitar el reflujo. En la Tabla 1 se detallan las drogas y dosis usadas en este trabajo.

Nombre	Proveedor	Catálogo	Volumen inyectado (por hemi-hipocampo)	Concentración inyectada
DEL-22379 (DEL)	MedChem Express	HY- 18932	0.5 $\mu$ L	400 nM
EGF	ThermoFisher	PHG0314	0.5 $\mu$ L	100 $\mu$ M
BCI-215 (BCI)	Axon Medchem	2852-10	0.5 $\mu$ L	3 $\mu$ M

**Tabla1.** Drogas usadas en este trabajo.

### M3.1 - Determinación del sitio de inyección.

En todos los experimentos en los que se realizaron inyecciones, una vez finalizado el experimento eutanasiamos a los animales por dislocación cervical, y extrajimos los cerebros. Los mismos fueron fijados por inmersión en una solución al 4% de paraformaldehído durante por lo menos 24hs. Por último, determinamos la precisión del sitio de inyección de manera macroscópica cortando el cerebro en secciones con la ayuda de una matriz y observando bajo lupa el trazo de la aguja en el tejido. Sólo se incluyeron en los análisis aquellos animales en los que se pudo verificar que la inyección fue realizada en el área CA1 del hipocampo dorsal ([figura M2](#)).



**Figura M2 | Inyecciones en el hipocampo dorsal.** Secciones coronales del cerebro de ratones representando la zona blanco de inyección, la subregión CA1 del hipocampo dorsal. Se indica la distancia respecto al bregma (-1.58 a -2.30 mm). Para hacer más clara la visualización, los círculos rojos representan el lugar en donde se inyectaron 40 animales seleccionados al azar de todos los que se inyectaron para este trabajo (la determinación del sitio de inyección se realizó con todos los animales). Las figuras de los cortes coronales se adaptaron del atlas de Paxinos y Franklin<sup>151</sup>.

## M4 - Ensayos bioquímicos.

### M4.1 - Obtención de extractos para determinación de dimerización de ERK2 por medio de geles nativos.

En los puntos temporales seleccionados, sacrificamos a los animales por dislocación cervical y rápidamente extrajimos el cerebro y disecamos al hipocampo. Inmediatamente después de la disección, homogeneizamos al hipocampo por medio de 8 golpes en un *dounce* (Wheaton) de vidrio de tipo B (o *tight*) en 250  $\mu$ l de buffer de lisis de dímeros (Hepes pH 7.5 20 mM, EGTA 10 mM,  $\beta$ -Glicerofosfato 40 mM, IGEPAL 1 % (w/v),  $MgCl_2$  2.5 mM,

Ortovanadato de Sodio 2 mM , DTT 1 mM, PMSF 0.5 mM, Fluoruro de Sodio 50 mM, Pepstatina A 1 µg/ml, Leupeptina 10 µg/mL, Aprotinina 10 µg/mL)<sup>152</sup>. Luego centrifugamos este homogenato por 10 minutos a 15000 g y 4°C. Por último, guardamos el sobrenadante para su uso y descartamos el pellet.

## M4.2 - Determinación de dimerización por *western blot* en geles nativos.

Para detectar dímeros de ERK2 utilizamos la técnica de *western blot* con geles nativos<sup>121,152</sup>. Determinamos la concentración de proteína de cada extracto mediante el kit de cuantificación de proteínas BCA Protein Assay Kit (Pierce) utilizando el protocolo establecido por el fabricante. Para la preparación de las muestras colocamos 90 µg de proteína total de cada extracto en buffer de siembra para geles nativos (glicerol 10 % (v/v), Tris-HCl pH 6.8 0.126 M). Luego realizamos la corrida electroforética en geles nativos de acrilamida:bisacrilamida al 8 % (*stacking gel*: 3.4 mL H<sub>2</sub>O, 830 µL acrilamida:bisacrilamida 37.5:1, 630 µL Tris-HCl pH 6.8 1 M, 50 µL APS (10 % w/v), 5 µL TEMED; *resolving gel*: 4.6 mL H<sub>2</sub>O, 2.7 mL acrilamida (30%, 37.5:1), 2.5 mL Tris-HCl pH 8.8 1.5 M, 100 µL APS 10 % w/v, 10 µL TEMED. Se realizó la electroforesis por 180 minutos a 60 V, y luego la electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa (General Electric, Hybond ECL cat. RPN203D) por 12 horas a 125 mA y 4°C.

Para la detección de dímeros y monómeros de ERK2, bloqueamos la membrana en solución de bloqueo (TTBS 0.05 % - Leche 4 %) por una hora a temperatura ambiente, y luego en anticuerpo primario contra ERK2 (Santa Cruz #1647, 1:1000 en solución de bloqueo) 12 horas a 4 °C. Al día siguiente realizamos 3 lavados de 5 minutos con TTBS 0.05 % e incubamos la membrana con anticuerpo secundario anti-mouse conjugado a peroxidasa (Cell Signaling #7076, 1:1000 en solución de bloqueo). Para la detección usamos el kit Clarity Western ECL (Bio-rad) y placas radiográficas Ortho CP-GU M (AGFA) reveladas en un equipo de revelado automático CP-1000 (AGFA). Por último, digitalizamos las placas radiográficas con el equipo Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences) y cuantificamos la densidad óptica de cada una de las bandas utilizando Fiji (versión 1.53)<sup>153,154</sup>.

## M4.3 - Obtención de extractos citosólicos para la detección de proteínas por medio de geles desnaturalizantes.

El protocolo de obtención de extractos citosólicos para la determinación de la fosforilación de ERK1/2 fue similar al de extractos de dimerización, excepto que la

homogeneización del hipocampo fue realizada en buffer A (10 mM HEPES pH 7,9; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM KCl; 1 mM DTT, Ortovanadato de Sodio 2 mM, DTT 1 mM, PMSF 0.5 mM, Fluoruro de Sodio 50 mM, Pepstatina A 1 µg/ml, Leupeptina 10 µg/mL, Aprotinina 10 µg/mL). Luego de homogeneizar el tejido centrifugamos por 15 minutos a 15000 g y 4 °C. El sobrenadante resultante corresponde a la fracción citosólica y fue almacenado a -20 °C hasta su uso.

#### M4.4 - Detección de proteínas por western blot desnaturalizante.

Para la preparación de muestras cuantificamos la concentración total de proteínas de cada extracto usando el BCA Protein Assay kit (Pierce). Luego, colocamos 30 µg de cada muestra con buffer de siembra desnaturalizante (SDS 2 %, glicerol 10 %, 2-mercatpo-etanol 5 %, Tris base 0.0625 M) y calentamos las muestras a 95 °C por 5 minutos. Realizamos la corrida electroforética en geles desnaturalizantes de 12.5% acrilamida:bisacrilamida por 90 minutos a 70 V y la transferencia a membranas de PVDF (Thermo Scientific). Incubamos las membranas con los anticuerpos específicos para las proteínas de interés (Tabla M2) y procedimos a la detección por quimioluminiscencia con el kit de detección Clarity Western ECL (Bio-rad) y digitalizadas con el equipo Amersham Imager 600.

En todos los casos en donde detectamos ERK fosforilado (pERK) y ERK total (tERK) en una misma membrana, primero incubamos con un anticuerpo contra ERK fosforilado. Una vez hecha la detección continuamos con un protocolo de *stripping fuerte*<sup>155</sup> para luego incubar con un anticuerpo contra ERK total. Por último, se utilizó Fiji para la cuantificación de la densidad óptica de cada una de las bandas detectadas.

Proteína blanco	Concentración	Marca	ID
ERK1/2 fosforilado (pERK)	1:1000	Cell Signaling Technology	#9101
ERK1/2 (tERK)	1:1000	Cell Signaling Technology	#9102
ERK2	1:1000	Santa Cruz	#1647
MKP3	1:500	Santa Cruz	#377070
c-Fos	1:500	Millipore	#ABE457

**Tabla M2.** Anticuerpos primarios usados.

#### M4.5 - Rodajas para inmunohistoquímica.

Con el objetivo de determinar qué áreas se activan luego del protocolo de reactivación de la memoria realizamos una inmunohistoquímica contra c-Fos, una proteína

ampliamente usada como indicador de actividad neuronal. Noventa minutos después de la sesión de re-exposición (tiempo que se corresponde con el pico de expresión en el núcleo de c-Fos luego de la estimulación<sup>156-158</sup>), anestesiarnos a los ratones con ketamina (160 mg/kg) y xilazina (64 mg/kg) y los perfundimos transcárdicamente con 20 mL de PBS heparinizado (NaCl 0.137 M, KCl 0.0027 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.01 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.0018 M, 0.1 % heparina) seguidos de 50 mL de PFA 4 %. Luego de la perfusión disecamos los cerebros y se post-fijaron por inmersión en PFA 4 % por 24 horas a 4 °C. Por último, realizamos la criopreservación en sacarosa 30 % v/v en PB 0,1 M (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.075 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.025 M), y los mantuvimos a 4 °C hasta su uso. Se realizaron cortes coronales de 40 µm de espesor en criostato (Leica Microm HM 505 N, temperatura de corte: -20 °C) y fueron almacenados en solución criopreservadora (30 % v/v glicerol, 30 % v/v etilenglicol, 40 % v/v PB 0.2 M ) a -20 °C.

#### M4.6 - Inmunohistoquímica para la detección de c-Fos.

Seleccionamos 10-15 cortes coronales en los que estuvieran presentes las áreas de interés y los permeabilizamos realizando dos incubaciones en PBS-Tritón 0,1 % de 10 minutos seguido de 3 incubaciones de 5 minutos en PBS (solución de lavado). Luego, bloqueamos en 1 % de suero de cabra normal (Sigma, #D9663) durante una hora. Después del bloqueo incubamos con el anticuerpo primario anti-c-Fos (Millipore, #ABE457, 1:500) en solución de bloqueo por 24 hs a temperatura ambiente.

Para la detección realizamos incubamos con anticuerpo secundario donkey α-rabbit Alexa 488 (Jackson ImmunoResearch, #711-545-152,1:200). Por último, realizamos una incubación con DAPI (1:200) de 10 minutos en PB.

Finalizado el protocolo de inmunohistoquímica, montamos los cortes en portaobjetos de vidrio gelatinizados y usamos Mowiol como medio de montaje. Guardamos los preparados a 4 °C hasta el momento de la adquisición de imágenes.

#### M4.7 - Adquisición y procesamiento de imágenes por microscopía confocal.

Adquirimos imágenes con microscopio confocal Zeiss LSM900 y un objetivo 20x (Carl Zeiss, Plan Apochromat, NA 0.8). Identificamos las distintas regiones de interés (Tabla M3) y capturamos entre 2 y 4 imágenes de cada una de ellas por ratón con una resolución de 512 x 512 píxeles y *stacks* de imágenes en el eje z que abarcaron todo el grosor de la sección (aproximadamente 15 imágenes en el eje z).

Para el análisis de las imágenes obtenidas utilizamos scripts de Fiji<sup>153</sup>. Brevemente, primero creamos una máscara delimitando la región de interés (Tabla M3). Luego, tomamos la señal correspondiente a c-Fos en todo el stack adquirido, y la colapsamos en una proyección de máxima intensidad. Por último, contamos manualmente los núcleos que presentaban señal de c-Fos dentro de la máscara delimitada.

Nombre	Abreviatura	Rango antero-posterior (respecto al bregma)
CA1	CA1	-1.46 a -2.46
CA2	CA2	-1.46 a -2.46
CA3	CA3	-1.46 a -2.46
Giro dentado	DG	-1.46 a -2.46
Corteza Retroesplenial	RSC	-1.46 a -2.46
Amígdala Lateral	LA	-1.06 a -1.70
Corteza Cingulada Anterior	Cg	1.78 a 1.42
Corteza Infralímbica	IL	1.78 a 1.42
Corteza Prelímbica	PrL	1.78 a 1.42

**Tabla M3.** Regiones de interés para la adquisición de imágenes con sus respectivas abreviaturas, y el rango en el eje antero-posterior tenido en cuenta (respecto al bregma), tomado del atlas de Paxinos y Franklin<sup>151</sup>.

## M5 - Obtención de rodajas agudas para electrofisiología.

Los experimentos de LTP fueron realizados en colaboración con el laboratorio dirigido por el Dr. Francisco Urbano (IFIBYNE - UBA / CONICET). Para la obtención de rodajas anestesiábamos a los animales con ketamina y los sacrificamos por decapitación. Rápidamente disecamos al cerebro y realizamos cortes coronales de 400  $\mu\text{m}$  de grosor en vibrátomo (PELCO Easyslicer, Ted Pella Inc.) en solución de corte (250 mM sacarosa, 2.5 mM KCl, 3 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.4 mM ácido ascórbico, 3 mM myo-inositol, 2 mM ácido pirúvico, 25 mM D-glucosa y 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ ) a 4 °C. Una vez obtenidas las rodajas, las incubamos en líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF, 125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 3 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.4 mM ácido ascórbico, 3 mM myo-inositol, 2 mM ácido pirúvico, 25 mM D-glucosa, and 25 mM  $\text{NaHCO}_3$  aireado con 95 %  $\text{O}_2$ /5 %  $\text{CO}_2$ , pH 7.4) por media hora a temperatura ambiente antes de iniciar el protocolo experimental.

Para la inducción de LTP por estimulación de alta frecuencia (hfs) se colocaron electrodos de registro en el *stratum radiatum* de la región CA1 del hipocampo. Los

potenciales postsinápticos excitatorios de campo (fEPSP) se registraron como medida de la transmisión sináptica excitatoria local en la región CA1. El electrodo de estimulación se posicionó en las fibras colaterales de Schaffer, y los fEPSP se evocaron mediante estímulos de prueba (0.033 Hz, 0.05-0.2 ms de duración) cada 30 segundos. La potenciación a largo plazo (LTP) se indujo aplicando estimulación de alta frecuencia (HFS; 5 trenes, 100 Hz, 10 pulsos) tras un período de línea base registrado de 10 minutos. Las grabaciones se mantuvieron durante 30 minutos después de la inducción de LTP. La magnitud de la LTP se calculó como un porcentaje del valor de la pendiente del fEPSP después de la HFS en comparación con las pendientes promedio del fEPSP en la línea base. Las señales se registraron utilizando un amplificador MultiClamp 700 controlado por el software pCLAMP 10.0 (Molecular Devices, CA, USA). Los datos se filtraron a 5 kHz, se digitalizaron y se almacenaron para análisis posterior.

## M6 - Análisis estadístico.

Todos los análisis estadísticos se realizaron usando *R* (version 4.2.2)<sup>159</sup> y *RStudio*<sup>160</sup>. Se hicieron modelos lineales generalizados usando la librería *glmmTMB*<sup>161</sup>. Para verificar el adecuado cumplimiento de los supuestos de los modelos seleccionados evaluamos visualmente el ajuste a la homocedasticidad de la varianza graficando la dispersión de los residuos, y además confirmamos analíticamente la homocedasticidad y normalidad usando la librería *DHARMA*<sup>162</sup>. Para realizar comparaciones *post-hoc* entre grupos usamos la librería *emmeans*<sup>163</sup> y se ajustó el p-valor por comparaciones múltiples usando el método Tukey. Para todos los casos p-valores menores a 0.05 se consideraron significativos. Las figuras fueron realizadas con R.

### M6.1 - Datos comportamentales.

Para analizar la latencia de entrada al compartimiento oscuro el día de la evaluación realizamos un modelo lineal generalizado mixto (GLMM) en donde se definieron como variables de efectos fijos la droga (droga o vehículo) y la reactivación (re-expuesto o no re-expuesto). El modelo se ajustó usando una distribución de la familia Gamma y una función de enlace *log*. Para todos los experimentos mostrados en este trabajo se analizaron también las sesiones de entrenamiento y de evaluación, y no se encontraron diferencias entre grupos en ningún caso. Se grafica en todos los casos como puntos las latencias individuales de cada animal, además de la mediana y el rango intercuartil. Incorporamos además *Cumming*

*Estimation plots* (realizados con el paquete *dabestr*<sup>164</sup>) en la visualización de los datos de la sesión de evaluación. Estos gráficos incluyen una estimación del tamaño de efecto al incluir la diferencia de medianas entre los grupos ( $\Delta$  medianas), mostrado como una distribución construida por *bootstrapping* con su respectivo intervalo de confianza para la estimación (95% CI)<sup>164,165</sup>.

## M6.2 - Datos bioquímicos.

Para analizar los datos provenientes de los *western blots* realizados, primero cuantificamos la densidad óptica de cada banda de interés. En los casos en donde queríamos determinar los niveles de fosforilación (banda correspondiente a la señal de pERK), la misma fue luego relativizada a la densidad óptica correspondiente a la banda de ERK total (tERK), obteniendo un índice de fosforilación (pERK / tERK) para cada muestra. Por último, relativizamos este índice de fosforilación al del grupo control del experimento, para así expresar los cambios en la fosforilación como cambios relativos al control. En el caso de MKP3, utilizamos la tinción con Rojo Ponceau como control de carga. Para ello se cuantificaron 3 regiones de interés promediadas dentro de todo el rango de corrida electroforética obtenida. Por último, también hicimos la relativización al grupo control del experimento.

Para el análisis estadístico ajustamos un modelo lineal general mixto en donde definimos como variables de efectos fijos a los droga (droga o vehículo) y reactivación (re-expuesto, no re-expuesto o naive), dependiendo del experimento.

En los gráficos se muestran los valores individuales de cada extracto con círculos, y la media y desvío estándar del grupo. También incluimos el uso de *estimation plots* para visualizar el tamaño de efecto encontrado.

Para los experimentos de inmunohistoquímica contamos manualmente la cantidad de células c-Fos positivas (c-Fos<sup>+</sup>). Luego realizamos un modelo lineal general mixto usando el entrenamiento (shock fuerte o shock débil) y re-exposición (re-expuesto o no re-expuesto) como variables de efectos fijos. Además, teniendo en cuenta la falta de independencia de los datos, ya que se cuantificaron varias imágenes provenientes de un mismo ratón, incluimos al ratón como variable de efectos aleatorios. Para la visualización de datos se muestran como círculos grandes el promedio de cada animal, y con círculos pequeños cada imagen (el código de color indica de que animal proviene cada imagen), además de la media y desvío estándar.



## Resultados

## Capítulo R1 - Dimerización de ERK

Los resultados mostrados en la figura R1.2 correspondientes a los experimentos con cultivos primarios fueron realizados en el laboratorio de la Dra. María Verónica Báez (IBCN, Facultad de Medicina, UBA).

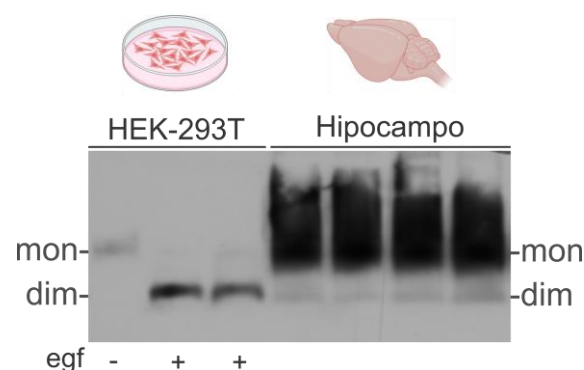
Los resultados mostrados en la figura R1.3 correspondientes a los experimentos de LTP en rodajas agudas fueron realizados en el laboratorio del Dr. Francisco J. Urbano (IFIBYNE, UBA-CONICET).

### R1.1 - Dimerización *in vitro* e *in vivo*.

Con el objetivo de poner a punto las técnicas que luego nos permitirían avanzar en la investigación del rol de la dimerización de ERK en la reconsolidación de la memoria, lo primero que nos propusimos fue reproducir la técnica de *western blot* nativo para la detección de dímeros, publicada en Herrero *et al*<sup>121</sup>. Para ello, usamos extractos proteicos obtenidos a partir de cultivos de la línea celular HEK-293T, estimulados con EGF (100 ng/ml por cinco minutos) y controles incubados con vehículo. Como se observa en la [figura R1.1](#), y en línea con lo reportado anteriormente<sup>121</sup>, detectamos una banda de menor velocidad de migración para las muestras provenientes de HEK-293T, compatible con la presencia de monómero en los extractos control, y una de migración más rápida correspondiente a la presencia de dímeros de ERK2 en el caso de los extractos estimulados con EGF. Estos resultados confirman el éxito de replicación de lo observado en los trabajos previos<sup>121,152</sup>.

Luego, nos preguntamos si esta misma técnica nos permitiría detectar la presencia de dímeros en homogenatos de tejido cerebral de ratón. Para responder esta pregunta realizamos extractos proteicos de hipocampo de animales naive, que corrimos con las muestras provenientes de HEK-293T. En este caso podemos observar una banda de mayor movilidad electroforética compatible con la presencia de dímeros, y un conglomerado de menor velocidad de migración cuya región de mayor movilidad resulta compatible con la de monómeros visualizados en extractos de células HEK293T. Sin embargo, a diferencia de lo detectado en cultivo celular de HEK-293T, en todos los casos detectamos tanto la presencia de dímeros como monómeros.

En base a estas observaciones, decidimos proseguir el estudio del rol de la dimerización en procesos de plasticidad usando cultivo primario.



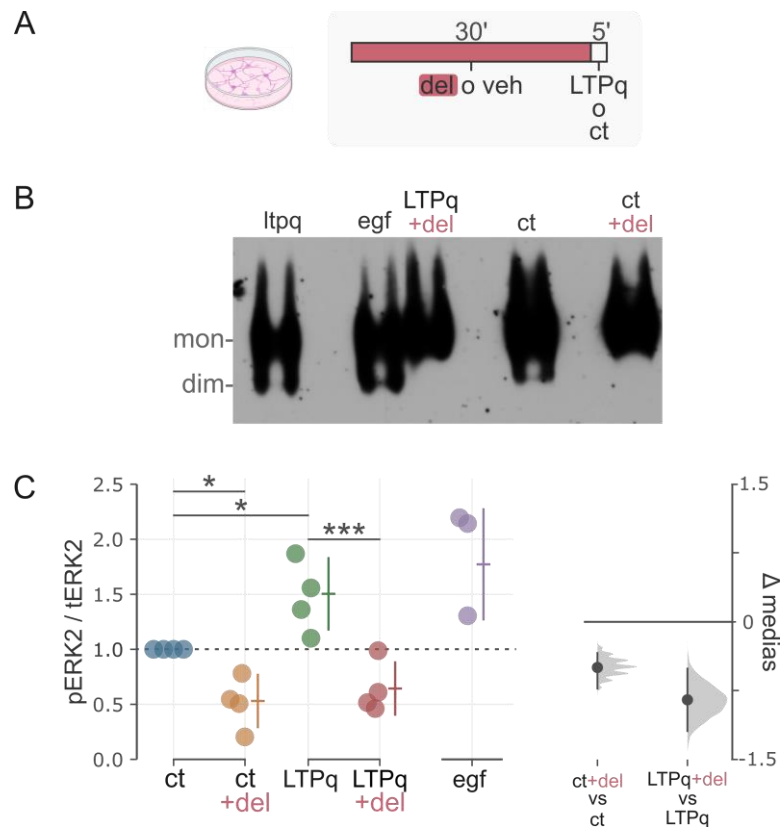
**Figura R1.1 | Detección de dímeros de ERK2.** Imagen de un western blot nativo con extractos proteicos de hipocampo de ratones corridos junto con extractos provenientes cultivos de líneas celulares HEK-293T.

## R1.2 - Dimerización de ERK2 en cultivo primario luego de un protocolo de LTP químico.

Considerando que el rol de la dimerización de ERK en procesos de plasticidad no ha sido estudiado, decidimos empezar usando cultivos primarios de neuronas de rata sometidos a un protocolo de LTP químico (LTPq). Además, incorporamos el uso de la droga DEL-22379 (DEL), un inhibidor previamente descrito como inhibidor específico de la dimerización que no afecta la fosforilación<sup>121,166</sup>. Brevemente, las placas del cultivo fueron divididas en 5 grupos: un par en donde se realizó un protocolo de LTP químico y además se incubó con DMSO o DEL (LTPq y LTPq+DEL, respectivamente) y otro par control que no pasó por la inducción de LTPq y se incubó con DMSO o DEL (CT y CT+DEL, respectivamente), y un quinto grupo que fue estimulado con EGF y sirvió como control positivo de inducción de la dimerización de ERK2 ([figura R1.2A](#)).

En la [figura R1.2B](#) se muestra un gel representativo de los experimentos realizados (tres repeticiones independientes). En las muestras incubadas con del (LTPq+DEL y CT+DEL) no se detectaron dímeros, a diferencia de lo observado tanto en las muestras CT como en las LTPq. Esto sugiere que DEL es capaz de impedir la dimerización de ERK2, incluso en condiciones basales.

En contraste con reportes anteriores<sup>121</sup>, al analizar el efecto de DEL en la fosforilación de ERK2 luego de un protocolo de LTPq, encontramos que la droga inhibe la fosforilación, tanto en las muestras estimuladas como en los controles (LTPq+DEL vs LTPq,  $p=0.0006$ ; CT+DEL vs CT,  $p=0.034$ ; [figura R1.2C](#), [tabla R1S1](#)).



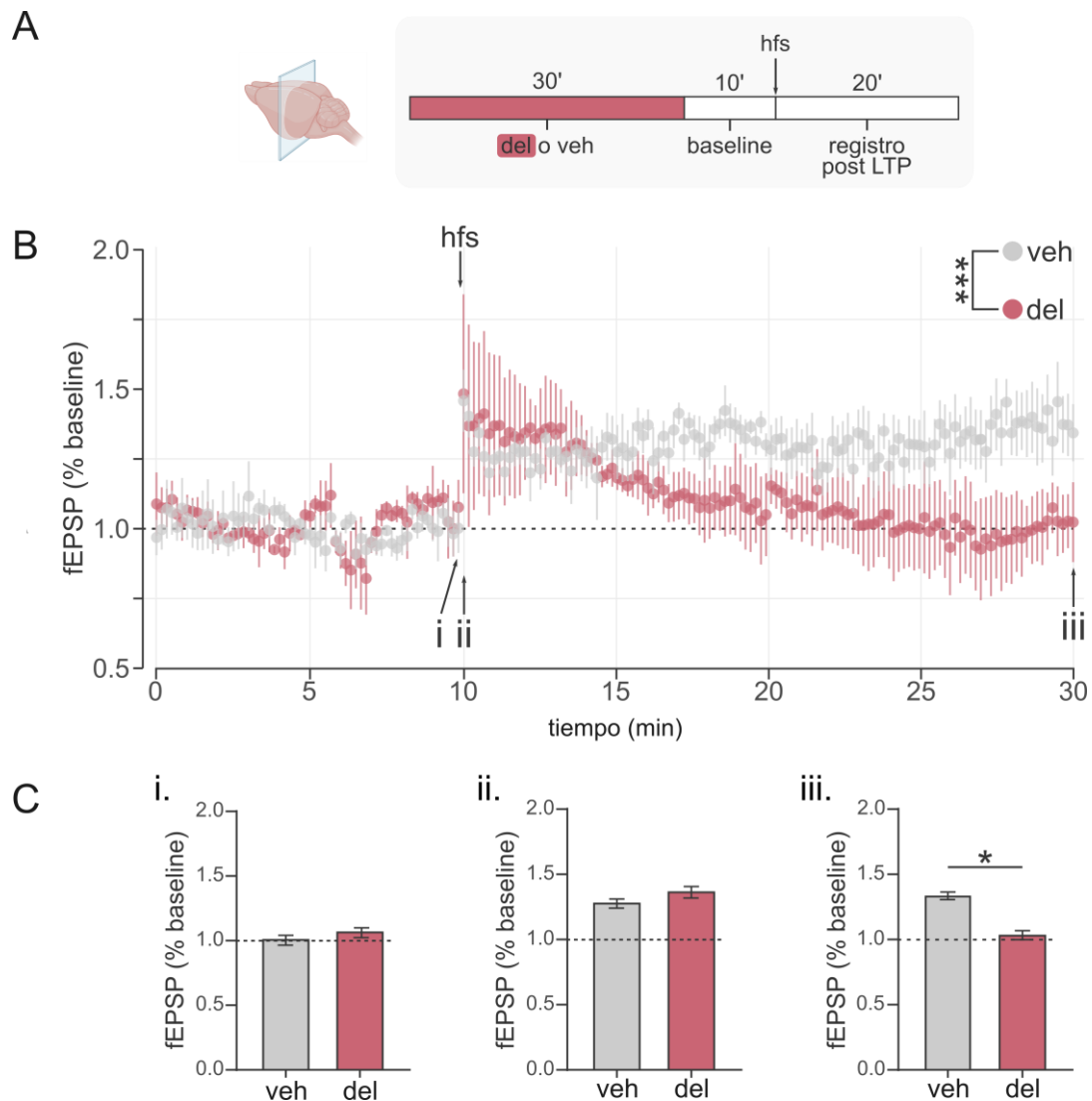
**Figura R1.2 | La inducción de LTPq aumenta la dimerización en cultivos primarios de ratas.** (A) Diseño experimental para la recolección de extractos cinco minutos después de la inducción de LTq. (B) Imagen representativa de un western blot nativo (de 4 réplicas independientes) realizado para la detección de dímeros de ERK2. (C) Niveles de densidad óptica relativa de la relación de pERK2/tERK2 relativizada al grupo control para determinar niveles de activación de ERK2. La línea punteada se corresponde al grupo control (ct). Se usan *Cumming estimation plots* para mostrar los datos correspondientes a cada animal (puntos), la media y desvío estándar de cada grupo. A la derecha se muestra el tamaño de efecto usando una *bootstrap sampling distribution* de la diferencia de medias. La diferencia de medias se grafica con un punto y las líneas de error marcan el 95 % CI de esta. El detalle estadístico se encuentra en la [tabla R1S1](#). n = 4 / grupo.

### R1.3 - Efecto de inhibir la dimerización luego de un protocolo de LTP inducido por estimulación de alta frecuencia en rodajas de hipocampo de ratón.

Teniendo en cuenta que las determinaciones realizadas luego del LTP químico en cultivo primario no nos permiten derivar conclusiones sobre el efecto de la inhibición de la dimerización en la plasticidad, nos propusimos realizar un experimento utilizando rodajas agudas de hipocampo de ratón. La inducción de LTP en este modelo nos permite observar cambios en la eficacia sináptica luego de una estimulación que induce plasticidad, y corroborar el efecto de inhibir la dimerización de ERK sobre los mecanismos de plasticidad.

Brevemente, realizamos rodajas del cerebro que fueron incubadas durante 30 minutos con DEL o vehículo previo a la estimulación. Luego, se realizó el lavado de la droga y los fEPSP evocados fueron registrados durante 10 minutos (baseline). Una vez finalizado

el periodo correspondiente al baseline inducimos LTP por medio estimulación de alta frecuencia (*hfs*, 5 trenes, 100 Hz, 10 pulsos). Luego de la inducción de LTP continuamos registrando los fEPSP durante 20 minutos ([figura R1.3A](#)). En la [figura R1.3B](#) se grafica la pendiente de los fEPSP relativizada al baseline. Observamos que, inmediatamente después de la estimulación de alta frecuencia, hay una potenciación de los fEPSP respecto de al baseline, tanto para las rodajas incubadas con del como para las incubadas con vehículo (media y desvío estándar de la pendiente de los fEPSP: VEH =  $1.45 \pm 0.12$ , DEL =  $1.47 \pm 0.16$ , [figura R1.3B, R1.3Cii](#)). Es decir, en ambos casos es posible inducir LTP, y no encontramos diferencias entre las rodajas incubadas con DEL cuando son comparadas con las incubadas con vehículo (VEH vs DEL,  $p = 0.508$ ; [figura R1.3Cii](#)). Sin embargo, hacia el final del periodo de registro post-estimulación, las rodajas tratadas con vehículo aún mantienen niveles altos de potenciación respecto al baseline (VEH =  $1.34 \pm 0.21$ ), y significativamente mayor que las rodajas tratadas con DEL, mientras que los niveles de potenciación de estas últimas decaen a valores similares al del baseline (DEL =  $1.02 \pm 0.20$ , [figura R1.3B, R1.3Ciii](#)). A partir de estos resultados, podemos concluir que, si bien la incubación con DEL no afecta el baseline ni la inducción de LTP por estimulación de alta frecuencia en CA1 de ratón, la misma afecta de manera significativa su mantenimiento a lo largo del tiempo (ANOVA de medidas repetidas, Droga x Tiempo:  $F = 41.103$ ,  $p = 1.44 \times 10^{-10}$ , [figura R1.3B](#)).



**Figura R1.3 | Inhibir la dimerización con DEL-22379 (del) impide el mantenimiento de LTP.** (A) Protocolo experimental. (B) Pendiente de los fEPSP relativizados al periodo de baseline para rodajas incubadas con DEL o con vehículo (veh). La flecha indica el momento en el que se aplica la estimulación de alta frecuencia (hfs). Se indican tres puntos de interés a lo largo del registro: inmediatamente antes de la estimulación (i), inmediatamente después de la estimulación (ii), y el último punto del periodo de registro (iii). Se grafica la media (puntos) y DE (barras de error) de cada punto temporal registrado. (C) Detalle de los periodos de interés destacados en (B). Se grafica la media y DE de los registros durante (i), (ii) y (iii) indicados en (B). En (B) los asteriscos indican el efecto significativo de la interacción entre tiempo y tratamiento ( $p = 1.44 \times 10^{-10}$ ). En (C) el asterisco indica la diferencia significativa para el último registro del experimento usando la prueba post hoc de Tukey. El detalle estadístico se encuentra en la [tabla R1S2](#).  $n = 4$  / grupo.

## R1.4 - Dimerización in vivo.

El LTP es considerado el sustrato principal del aprendizaje y la memoria<sup>167-170</sup>. Habiendo establecido una técnica para determinar niveles de dimerización de ERK2 en hipocampo de ratón (*western blot* nativo, [figura R1.1](#)), y dado el efecto del inhibidor de la dimerización observado en el mantenimiento de LTP ([figura R1.3](#)), decidimos utilizar esta herramientas para avanzar sobre el estudio del rol de la dimerización en la reconsolidación

de la memoria de evitación inhibitoria. Como primer experimento, teniendo en cuenta los resultados observados en cultivo primario que muestran que DEL no inhibe solamente la dimerización en la concentración utilizada, sino que también tiene efectos sobre la fosforilación ([figura R1.2B](#)) decidimos realizar un primer experimento inyectando DEL en el hipocampo de ratones con el objetivo de determinar si en estas condiciones capaz de inhibir la dimerización sin afectar la fosforilación de esta vía.

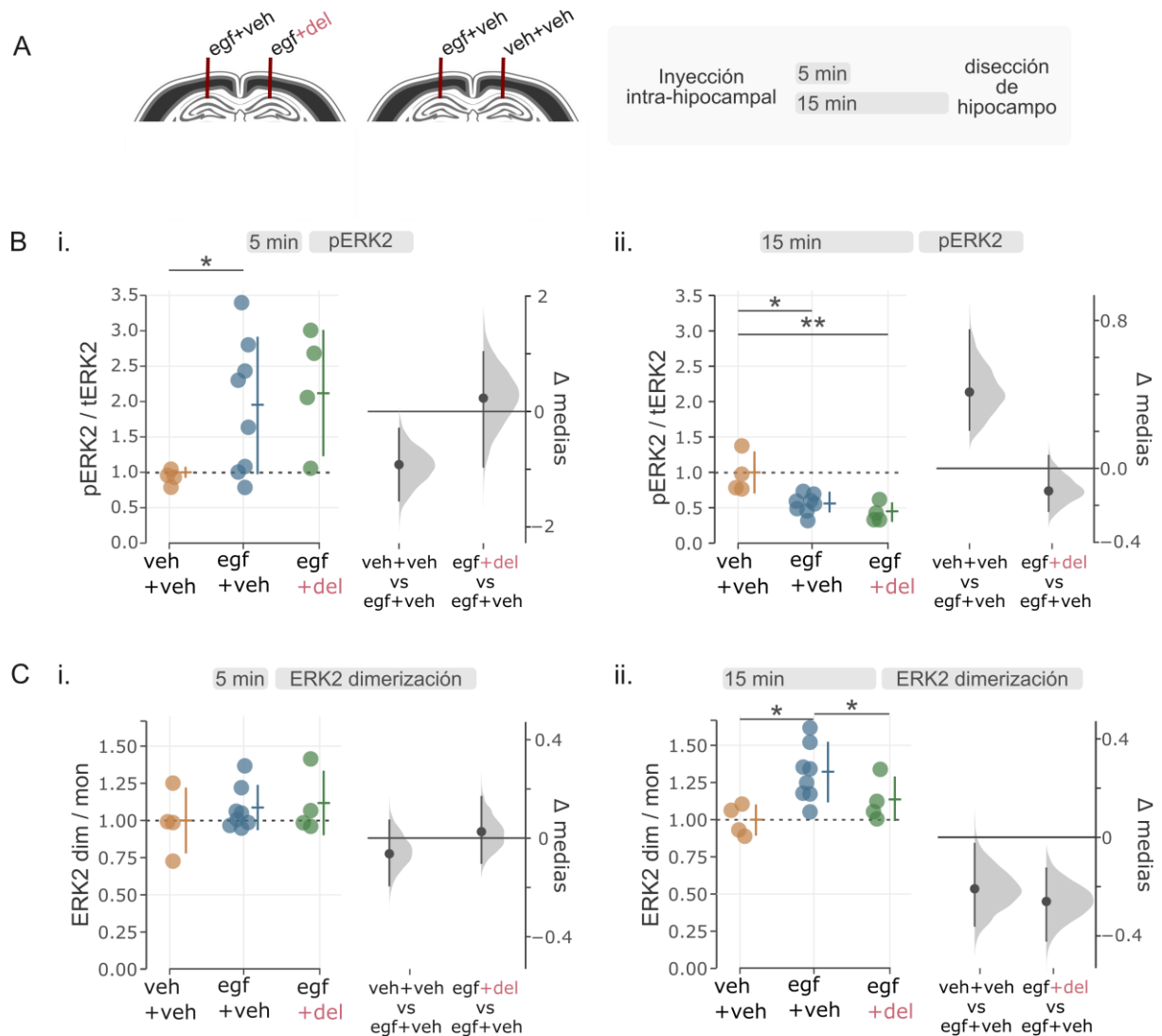
Brevemente, en este experimento nos propusimos evaluar el efecto de DEL sobre la dimerización inducida por EGF en el hipocampo de ratón. Para ello, utilizamos un protocolo de dos pasos: una instancia de estimulación de la vía (por la administración de EGF) y una de tratamiento con DEL. Quedaron definidas entonces tres combinaciones de inyecciones: VEH+VEH (control negativo), EGF+VEH (control positivo de inducción de la fosforilación y dimerización) y EGF+DEL. De este modo, un grupo de ratones fue inyectado con VEH+VEH en un hemi-hipocampo y EGF+VEH en el otro hemi-hipocampo, mientras que otro grupo de ratones fue inyectado con EGF+VEH en un hemi-hipocampo, y EGF+DEL en el otro. Este protocolo experimental, en donde cada ratón es su propio control, disminuye la variabilidad y nos permite usar menos animales. Evaluamos el efecto de las administraciones intra-hipocampales 5 y 15 minutos después de la última inyección. Luego realizamos homogenatos proteicos para determinar los niveles de dimerización y de fosforilación de ERK2 ([figura R1.4A](#)).

Observamos que 5 minutos después de la administración de EGF hay un aumento significativo en los niveles de fosforilación de ERK2 en el control positivo (EGF+VEH vs VEH+VEH,  $p = 0.0492$ ; [figura R1.4Bi](#), [tabla R1S3](#)). Si bien no se encontró un aumento significativo en la fosforilación para el grupo EGF+DEL al ser comparado con el control (EGF+DEL vs VEH+VEH,  $p = 0.051$ , [figura R1.4Bi](#), [tabla R1S3](#)), este grupo no difiere significativamente del grupo EGF+VEH (EGF+DEL vs EGF+VEH,  $p = 0.989$ , [figura R1.4Bi](#), [tabla R1S3](#)). En cambio, a los 15 minutos observamos una disminución significativa de la fosforilación de ERK2 en ambos grupos inyectados con EGF respecto del control, que no difieren entre ellos (EGF+VEH vs VEH+VEH,  $p = 0.010$ ; EGF+DEL vs VEH+VEH,  $p = 0.009$ ; EGF+VEH vs EGF+DEL,  $p = 0.55$ ; [figura R1.4Bii](#), [tabla R1S3](#)). Estos resultados confirman que DEL, en la dosis utilizada, no interfiere con la fosforilación de ERK2 inducida por EGF en hipocampo de ratón *in vivo*.

Con respecto a las mediciones del estado de dimerización, no observamos cambios 5 minutos luego de la administración de EGF ([figura R1.4Ci](#), [tabla R1S3](#)). En cambio,



encontramos un aumento significativo de la dimerización 15 minutos después de la inyección de EGF (EGF+VEH vs VEH+VEH,  $p = 0.014$ , [figura R1.4Cii](#)), que resultó inhibido significativamente por la administración de DEL (EGF+VEH vs EGF+DEL,  $p = 0.301$ , [figura R1.4Cii](#)).



**Figura R1.4 | DEL-22379 (del) inhibe la dimerización de ERK2 *in vivo* sin alterar su fosforilación.** (A) Protocolo experimental. (B) Cuantificación de los niveles de fosforilación de ERK2 5 (i) o 15 (ii) minutos después de la inyección intra-hipocampal. (C) Cuantificación de los niveles de dimerización de ERK2 5 (i) o 15 (ii) minutos después de la inyección intra-hipocampal. El detalle estadístico completo se encuentra en la [tabla R1S3](#).  $n = 4$  ratones / grupo.

## R1.5 - Dimerización de ERK2 en la reconsolidación del IA.

Considerando que:

- a) pudimos poner a punto un protocolo para la detección de dímeros de ERK2 en hipocampo de ratón ([figura R1.1](#)),
- b) establecimos que un protocolo de estimulación de LTP químico induce la dimerización en cultivos primarios de rata ([figura R1.2](#)),
- c) que el mantenimiento de LTP en rodajas agudas de hipocampo de ratón se ve impedido por el tratamiento con DEL ([figura R1.3](#)),
- d) la administración de DEL en el hipocampo reduce los niveles de dimerización de ERK2 sin afectar su fosforilación ([figura R1.4](#)),
- e) la activación de ERK2 citosólica es finamente regulada en el hipocampo de ratón durante la reconsolidación de la memoria de IA, y que su inhibición a los 45 min de la reactivación de una memoria débil induce su fortalecimiento<sup>146</sup>,

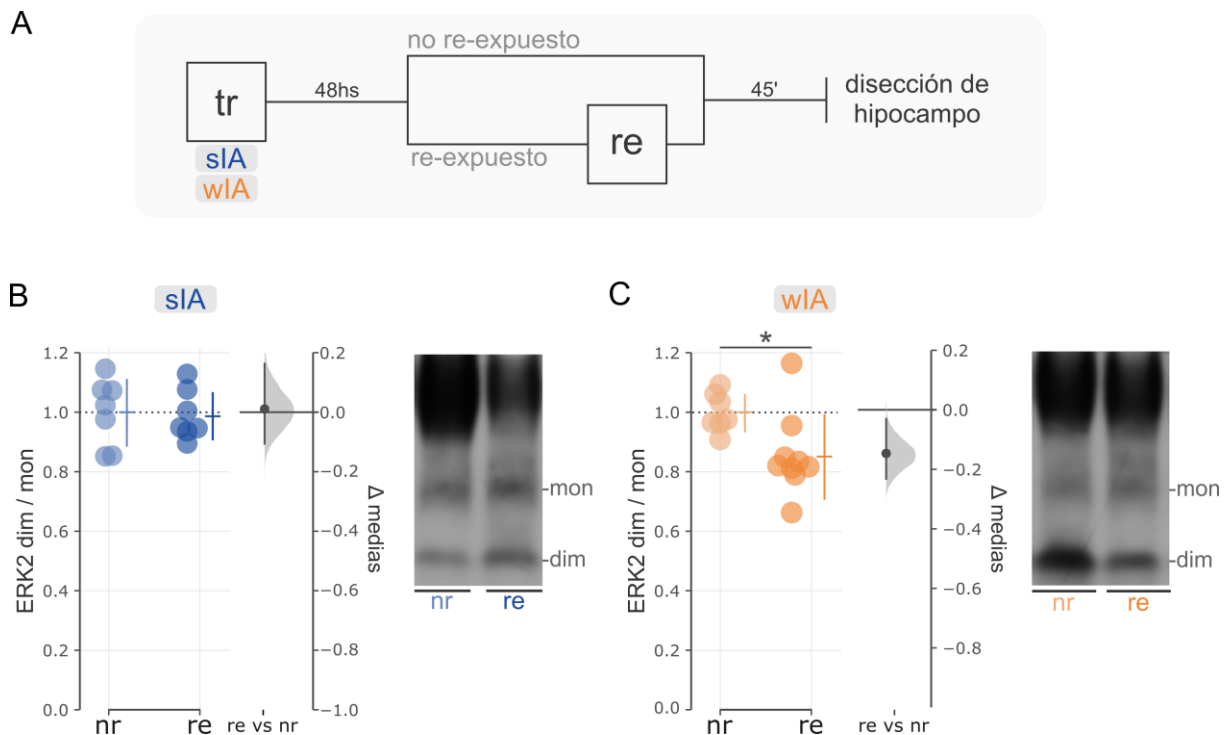
nos propusimos evaluar el rol de la dimerización de ERK2 en la reconsolidación de la memoria de evitación inhibitoria.

Para este objetivo, realizamos un primer par de experimentos en donde dos grupos de animales fueron entrenados en la tarea de evitación inhibitoria. La mitad de los mismos fue entrenada con la versión que utiliza un shock débil (wIA), y la otra mitad con la de shock fuerte (sIA). Cuarenta y ocho horas después del entrenamiento seleccionamos aleatoriamente la mitad de los animales de cada uno de estos grupos para re-exponerlos al dispositivo experimental (grupos RE), mientras que el resto de los animales permanecieron en sus jaulas (grupos NR). Cuarenta y cinco minutos después de la re-exposición (o en tiempos equivalentes para los grupos NR) eutanasiamos a los animales por dislocación cervical, diseccionamos el hipocampo y realizamos los homogenatos ([figura R1.5A](#)) para la determinación de los niveles de dimerización de ERK2.

Como se muestra en la [figura R1.5C](#), los animales entrenados con un shock débil y re-expuestos al contexto del entrenamiento presentan niveles de dimerización de ERK2 significativamente menores que los NR (wIA-RE vs wIA-NR,  $p = 0.0223$ ; [figura R1.5C](#), [tabla R1S4](#)).

En cambio, los animales entrenados con shock fuerte no presentaron diferencias significativas en los niveles de dimerización de ERK2 luego de la re-exposición (sIA-RE vs sIA-NR,  $p = 0.873$ ; [figura R1.5B](#)). Estos resultados nos sugieren que hay una cinética

diferencial de la dimerización luego de la re-exposición de la memoria que depende del tipo de entrenamiento utilizado 48 horas antes.



**Figura R1.5 | Los niveles de dimerización de ERK2 luego de la reactivación de una memoria de evitación inhibitoria dependen del tipo de entrenamiento usado.** (A) Protocolo experimental. (B) Nivel de dimerización de ERK2 hipocampal para los animales entrenados en IA con un shock fuerte (sIA). A la derecha se muestra la imagen de un western blot representativo. (C) Nivel de dimerización de ERK2 hipocampal en animales entrenados en IA con un shock débil (wIA). A la derecha se muestra la imagen de un western blot representativo. El detalle estadístico se encuentra en la [tabla R1S4](#). n = 7-9 / grupo.

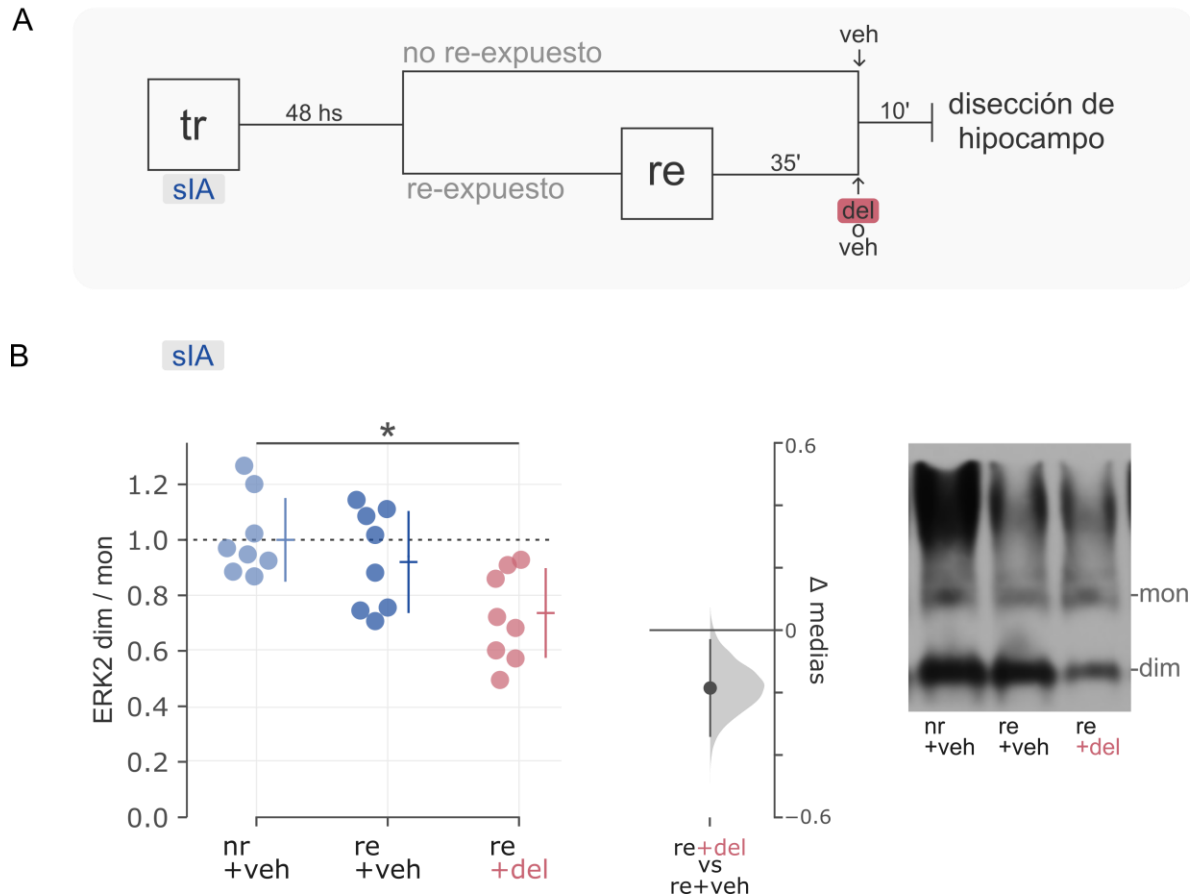
## R1.6 - Administración de DEL luego de la reactivación de la memoria de sIA.

En base a los resultados encontrados en el apartado anterior, nos preguntamos si los niveles de dimerización de ERK2 luego de la reactivación de la memoria en animales entrenados con un shock fuerte serían relevantes para la reestabilización de la traza mnésica. Es decir, dado que la reactivación de la memoria en animales entrenados con un shock débil (wIA) induce una disminución en los niveles de dimerización de ERK2, nos preguntamos si podíamos debilitar la traza mnésica de animales entrenados con un shock fuerte (sIA) mediante la inhibición de la dimerización de ERK en el hipocampo. Esto causaría que la latencia de ingreso de animales entrenados con sIA disminuyan, asemejándose a la de los entrenados con wIA.

Para responder esta pregunta, primero realizamos un experimento similar a los del apartado anterior, en donde entrenamos animales con un shock de intensidad fuerte. Cuarenta y ocho horas después del entrenamiento dos tercios de los animales fueron re-expuestos, mientras que un tercio permaneció en su jaula de cría. Treinta minutos después de la re-exposición inyectamos a los animales con DEL o vehículo intra-hipocampal (grupos RE+DEL y RE+VEH respectivamente), mientras que los animales no re-expuestos fueron inyectados con vehículo en tiempos correspondientes (grupo NR+VEH). Cuarenta y cinco minutos después de la re-exposición, diseccionamos los hipocampos y realizamos los homogenatos para la determinación de los niveles de dimerización de ERK2 ([figura R1.6A](#)). Como se puede observar en la [figura R1.6B](#), y reproduciendo el resultado observado anteriormente ([figura R1.5B](#)), la re-exposición de animales entrenados con sIA no produce un cambio significativo en los niveles de dimerización de ERK2 45 minutos después de la misma (NR+VEH vs RE+VEH,  $p = 0.5944$ ; [figura R1.6B](#), [tabla R1S5](#)). En cambio, la administración de DEL disminuye significativamente el nivel de dimerización respecto al grupo no re-expuesto e inyectado con vehículo (RE+DEL vs NR+VEH,  $p = 0.0102$ , [figura R1.6B](#), [tabla R1S5](#)). Este resultado nos permitió establecer que, en la dosis y tiempos utilizados, DEL es capaz de disminuir los niveles de dimerización de ERK2 hipocampal en animales que fueron entrenados con un sIA, reproduciendo así la cinética observada para los animales entrenados con shock débil en la [figura R1.5B](#).

Teniendo en cuenta estos resultados, y con el objetivo de evaluar el efecto que tiene disminuir la dimerización de ERK sobre la conducta, diseñamos un experimento en donde entrenamos a los animales con un shock fuerte. Cuarenta y ocho horas después, la mitad de los animales fueron re-expuestos y la otra mitad se mantuvieron en su jaula de cría. Cuarenta minutos después de la re-exposición (o en tiempos correspondientes para los animales no re-expuestos), inyectamos a los animales con DEL o vehículo. Así, los grupos experimentales quedaron conformados de la siguiente manera: RE+DEL, RE+VEH, NR+DEL y NR+VEH ([figura R1.7A](#)).

La inclusión del par de grupos de animales no re-expuestos e inyectados con droga o vehículo (NR+DEL y NR+VEH) es un control importante en los experimentos en donde se estudian efectos en la reconsolidación de la memoria, ya que nos permite establecer que los efectos observados en la sesión de evaluación son producto de la reactivación y labilización de la memoria, y no se deben a factores inespecíficos de la administración de la droga o a un efecto sobre consolidación extendida<sup>171</sup>.

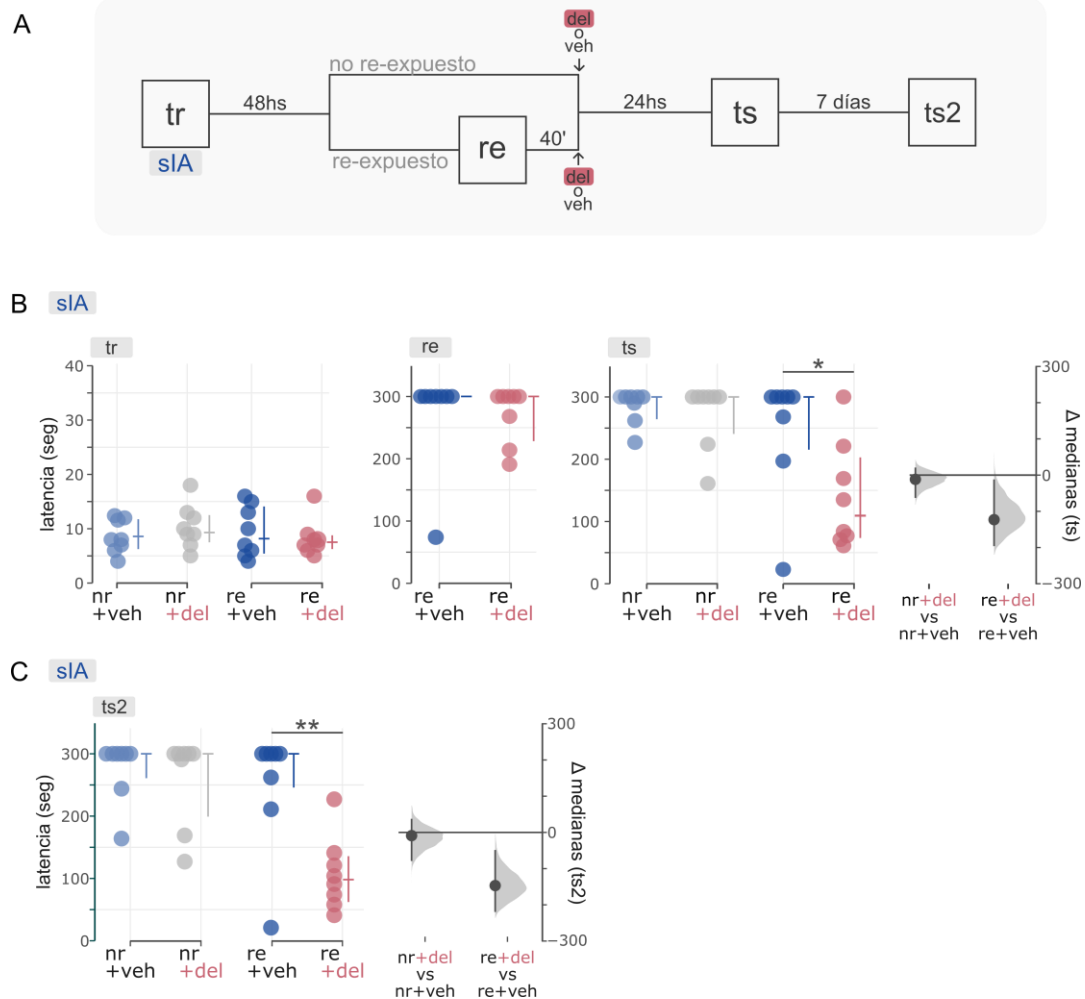


**Figura R1.6 | La administración de DEL-22379 después de la reactivación de la memoria de sIA reduce los niveles de dimerización de ERK2.** (A) Protocolo experimental. (B) Nivel de dimerización de ERK2 hipocampal (dímero / monómero) relativizada al grupo nr+veh. El detalle estadístico se encuentra en la [tabla R1S5](#). n = 8 / grupo.

En la [figura R1.7B](#) se puede observar que, como era esperable, los grupos no presentan diferencias significativas en la latencia de entrada al compartimiento oscuro en el día del entrenamiento ni de la re-exposición. Al evaluar el comportamiento de los animales veinticuatro horas después de la re-exposición (TS), se puede observar que los animales de grupo RE+DEL presentan latencias significativamente menores que los RE+VEH (RE+DEL vs RE+VEH,  $p = 0.0287$ , [figura R1.7B](#), [tabla R1S6](#)). Esta diferencia no se observa cuando los animales no pasan por la sesión de re-exposición (NR+DEL vs NR+VEH,  $p = 0.9833$ , [figura R1.7B](#), [tabla R1S6](#)), lo que sugiere que el efecto de inhibir la dimerización de ERK sobre la conducta es dependiente de la labilización de la memoria.

El cambio observado en el compartimento de los animales puede explicarse por dos fenómenos contrapuestos: un impedimento en la reconsolidación de la memoria original o la facilitación de una memoria de extinción que se exprese sobre la memoria original. Con el objetivo de discernir entre estas dos explicaciones, agregamos una nueva sesión de

evaluación (TS2) 7 días después de la sesión TS para evaluar la presencia de recuperación espontánea. Este es un fenómeno característico de las memorias de extinción, que se define como la reaparición de la respuesta condicionada en la memoria original después de un tiempo de haberse establecido una memoria de extinción<sup>172</sup>, por lo que un aumento en la latencia (es decir, la recuperación de la respuesta condicionada original) podría indicar que el efecto observado en TS es producto de una facilitación de la memoria de extinción. Como se puede ver [figura R1.7C](#), el grupo de animales RE+DEL mantiene la disminución en la latencia de ingreso en una segunda evaluación realizada 7 días después de la primera (RE+DEL vs RE+VEH,  $p = 0.0013$ , [figura R1.7C](#)). Este resultado, si bien no es definitivo y habría que realizar otros experimentos para poder sacar conclusiones más certeras, indicaría que la administración de DEL actuaría mediante un impedimento en la reconsolidación de la traza original.



**Figura R1.7 | La administración de DEL-22379 (del) luego de la reactivación de la memoria en animales entrenados con sIA causa un deterioro en la reconsolidación.** (A) Protocolo experimental. (B) Latencia de ingreso al compartimento oscuro durante el entrenamiento (tr), la sesión de re-exposición (re) y la sesión de evaluación (ts). (C) Latencia de ingreso en la sesión de evaluación ts2. Se grafica la latencia de ingreso de cada

animal (puntos), la mediana y el rango intercuartil (barras de error). Además, para las sesiones de evaluación (ts y ts2) se muestra el tamaño de efecto como diferencia de medianas graficando la *bootstrapped median difference distribution* en gris, indicando la diferencia de medianas (punto) y el 95% IC (barras de error). El detalle estadístico completo se encuentra en la [tabla R1S6](#).  $n = 8$  / grupo.

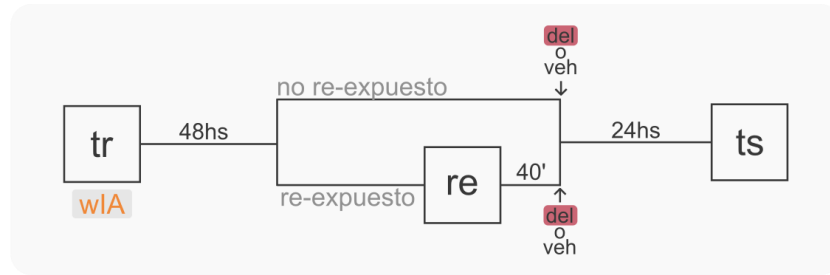
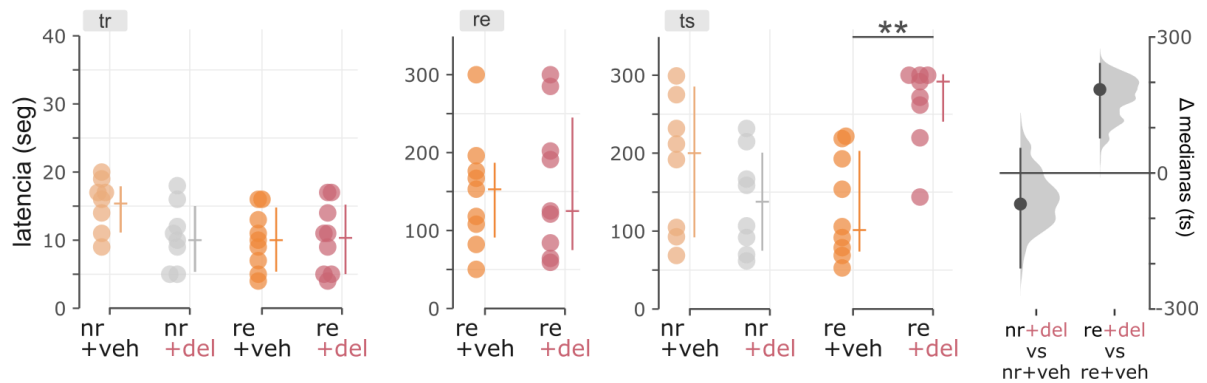
## R1.7 - Administración de DEL luego de la re-exposición de la memoria de wIA.

A diferencia de lo observado luego de la reactivación de la memoria de sIA, la reactivación de la memoria wIA indujo una disminución de la dimerización en el hipocampo ([figura R1.5C](#)). Nos preguntamos qué función cumple esta disminución en la reconsolidación de la memoria. Para esto, realizamos experimentos similares a los de la sección anterior, con la salvedad de que esta vez todos los animales fueron entrenados con un shock débil ([figura R1.8A](#)).

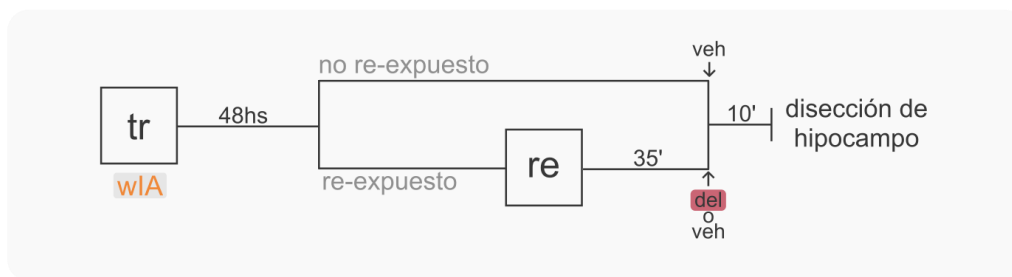
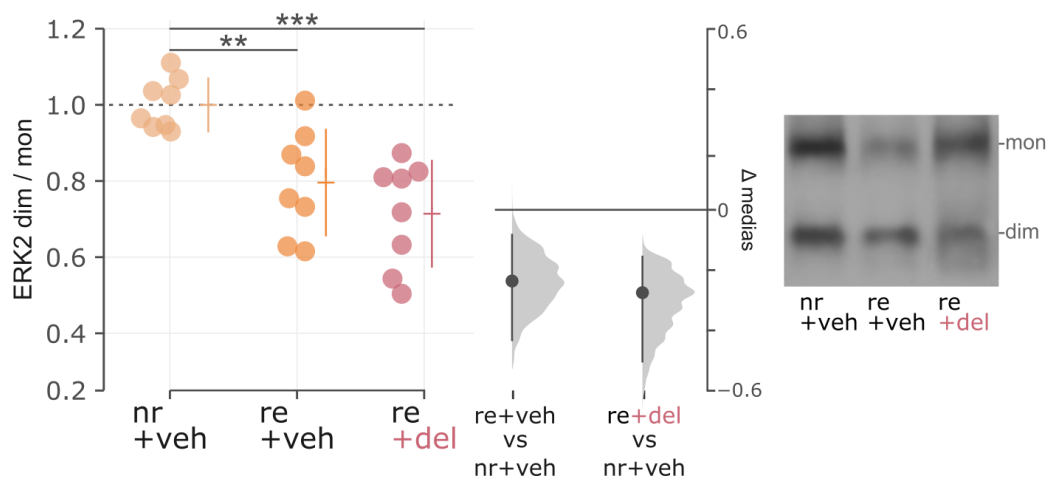
Como se puede observar en la [figura R1.8B](#), no se encontraron diferencias entre los grupos en las latencias de ingreso en el día del entrenamiento. Asimismo, los grupos re-expuestos presentaron latencias similares a lo que típicamente observamos en los experimentos con wIA ([tabla R1S7](#)). Sin embargo, la administración de DEL cuarenta minutos luego de la reactivación causó un aumento significativo en la latencia de ingreso en la sesión de evaluación (RE+DEL vs RE+VEH,  $p = 0.0049$ ; [figura R1.8B](#)). Este efecto puede ser atribuido a la reactivación de la memoria, ya que no se observa si los animales no pasan por la sesión de re-exposición (NR+DEL vs NR+VEH,  $p = 0.3786$ ; [figura R1.8B](#), [tabla R1S7](#)).

Nos propusimos analizar el efecto de la administración de DEL sobre los niveles de dimerización de ERK2 luego de la reactivación de la memoria de animales entrenados con wIA ([figura R1.8C](#)). Encontramos que, en la misma línea a lo observado en la [figura R1.5](#), la reactivación de la memoria de animales entrenados con un shock débil causa una disminución en la dimerización de ERK2 (NR+VEH vs RE+VEH,  $p = 0.0003$ , [figura R1.8D](#)). Al analizar el efecto de la administración intra-hipocampal de DEL encontramos que ésta no tuvo efecto en los niveles de dimerización de ERK2 (RE+VEH vs RE+DEL,  $p = 0.3753$ ; [figura R1.8D](#)). Esto podría deberse a un ‘efecto piso’, no siendo posible disminuir aún más el nivel de dimerización farmacológicamente cuando éste ya se encuentra disminuido por la manipulación conductual. Esto sugeriría que el efecto observado en la conducta podría deberse a una inhibición de la dimerización posterior a la observada, en el que la droga aún estaría teniendo efecto.

A

B **wIA**

C

D **wIA**

**Figura R1.8 | La administración de DEL-22379 tiene un efecto facilitador de la memoria wIA.** (A) Protocolo experimental. (B) Latencias de ingreso durante el entrenamiento (tr), la sesión de re-exposición (re) y el día de evaluación (ts). (C) Protocolo experimental para experimento de determinación de los niveles de dimerización luego de la administración de DEL-22379. (D) Nivel de dimerización (dímero / monómero) relativizada al grupo nr+veh. El detalle estadístico completo se encuentra en la [tabla R1S7](#). n = 8-9/grupo para (B) y 8 / grupo para (D).



## Capítulo R1 – Discusión

Inicialmente, la señalización de la vía de ERK/MAPK se pensaba como una simple secuencia lineal de eventos, que iniciaban con la activación de RAS y se desencadenaba de manera sucesiva la fosforilación de RAF y luego MEK, siendo esta última quinasa la encargada de activar a ERK ([figura I2](#)). Décadas de investigación dan cuenta de que detrás de la señalización mediada por ERK/MAPK hay una red regulatoria compleja que depende de varios efectores y sustratos, la interacción con proteínas de andamiaje<sup>103,173,174</sup>, fosfatasa<sup>107,175-177</sup> y otras modificaciones post-transduccionales como la dimerización ([figura I3](#)).

La integración de estos mecanismos regulatorios permite la regulación fina de la actividad de señalización en cuanto a frecuencia, amplitud, intensidad, especificidad espacial e interacción con sustratos, permitiendo una amplia gama de efectos biológicos. Si bien la dimerización de ERK1/2 fue inicialmente descrita en 1988<sup>113</sup>, el rol que tiene en procesos biológicos es aun mayormente desconocido. En este sentido, se ha propuesto que tiene un impacto en la intensidad de la señalización, ya que en su forma dimerizada ERK fosforilado tiene una actividad 20 veces mayor que como monómero<sup>120</sup>. Otro posible rol en el que ha sido implicada es en la capacidad de regular la especificidad espacial de la actividad de ERK. Si bien inicialmente se propuso que la dimerización era esencial para la translocación nuclear<sup>113</sup>, reportes más recientes indicarían que la dimerización sería un factor determinante en la señalización citosólica de la vía de ERK, al regular la interacción con proteínas de andamiaje que permiten la fosforilación de los sustratos citosólicos<sup>116</sup>.

Los resultados expuestos en este capítulo muestran que la dimerización de ERK2 tendría un rol subyacente a procesos de plasticidad y reconsolidación de la memoria de evitación inhibitoria en ratones.

En primer lugar, establecimos la presencia de dímeros de ERK2 en el hipocampo cerebral de ratón ([figura R1.1](#)), siendo este el primer reporte de dicho mecanismo en tejido del sistema nervioso. Luego, realizamos experimentos en cultivos primarios de neuronas de rata para evaluar el rol de la dimerización en procesos de plasticidad. Encontramos que la inducción de LTP químico con glicina en estos cultivos aumenta la expresión de dímeros de ERK2, así como la fosforilación de ERK2 ([figura R1.2](#)). Además, incorporamos en el experimento la droga DEL-22379, un inhibidor de la dimerización caracterizado previamente en modelos oncológicos<sup>121</sup>. Si bien los reportes iniciales de esta droga destacan su efecto específico sobre la dimerización sin afectar la fosforilación de ERK2, nuestros resultados indican que, en dichos cultivos, la droga además de impedir la dimerización está impidiendo

la fosforilación de ERK (figura R1.2). Esto puede deberse al sistema biológico estudiado, ya que se ha reportado que el efecto de DEL depende del contexto molecular<sup>178</sup>. Otra posible explicación de este efecto son las condiciones experimentales elegidas (dosis y/o tiempo de incubación usados). Una limitación de los experimentos realizados es que, si bien ha sido reportado que el protocolo de LTP químico comparte muchas características observadas para la inducción de LTP en rodajas agudas de hipocampo (ej., la inserción de receptores AMPA en la membrana, la remodelación de espinas y la fosforilación de receptores de NMDA<sup>179–182</sup>), carecemos de una medida observable de los cambios plásticos que suceden en estos experimentos. Por esta razón decidimos realizar experimentos en rodajas agudas de hipocampo de ratón induciendo LTP en el circuito CA1-Schaffer Collaterals, mediante estimulación de alta frecuencia. Este mecanismo de plasticidad es considerado como el sustrato principal del aprendizaje y la memoria<sup>168,169</sup>. Además, hay reportes de que el entrenamiento en la tarea de evitación inhibitoria es capaz de inducir LTP en el hipocampo<sup>167,183</sup>, por lo que este mecanismo cobra particular importancia en este contexto.

Los resultados presentados en esta tesis sugieren que la dimerización de ERK2 cumpliría un rol fundamental en el mantenimiento del LTP ([figura R1.3](#)). Mientras que tanto en las rodajas tratadas con DEL como con vehículo pudimos observar la inducción de la potenciación de los fEPSP, la misma se sostuvo en el tiempo solo para las rodajas tratadas con vehículo, pero decayó rápidamente a niveles basales en aquellas incubadas con DEL. Estos resultados deben considerarse como preliminares y ameritan profundizar más en el rol que tiene la dimerización en el establecimiento del LTP, pero definitivamente ponen de manifiesto la relevancia de la activación de determinados sustratos de la vía para el éxito de este proceso. La principal limitación en la interpretación de estos resultados está relacionada con lo mencionado anteriormente sobre la droga DEL, ya que desconocemos si en esta concentración está actuando solamente como un inhibidor de la dimerización, o también está impidiendo la fosforilación de ERK, otro mecanismo que se sabe es esencial para el establecimiento de LTP<sup>140,184–188</sup>.

Continuando con la investigación sobre el rol de la dimerización en procesos de memoria, encontramos que la administración de DEL-22379 es capaz de impedir *in vivo* la dimerización de ERK2 en el hipocampo de ratón inducida por EGF, sin afectar su fosforilación ([figura R1.4](#)), a diferencia de lo observado en cultivos primarios (figura R1.2). Este resultado es de especial importancia para nosotros, ya que nos permitió validar el uso de DEL-22379

como un inhibidor específico de la dimerización de ERK que no afecta su fosforilación, permitiéndonos su uso en futuros experimentos.

Al estudiar el proceso de reconsolidación de la tarea de evitación inhibitoria, encontramos una disminución significativa en los niveles de dimerización como producto de la reactivación para aquellos animales entrenados en la versión de IA que utiliza un shock débil (wIA), mientras que no hubo cambios en los animales entrenados con la versión que usa el shock fuerte (sIA) ([figura R1.5](#)). Este no es el primer reporte de una cinética diferencial de la vía de ERK1/2 en esta tarea, ya que resultados previos de nuestro laboratorio encontraron que en este mismo punto temporal hay un aumento de la fosforilación de ERK2 citosólica en hipocampo de animales del grupo wIA y una disminución para el grupo sIA<sup>145,146</sup>.

Estas dos líneas de investigación abren nuevas preguntas sobre los mecanismos de regulación que estarían actuando luego de la reactivación de la memoria. Si nos centramos en el protocolo de wIA, el aumento en la fosforilación en el compartimento citosólico reportado previamente parecería entrar en conflicto con la disminución en la dimerización que encontramos en este trabajo. Esto se debe a que la interacción de ERK con sus sustratos citosólicos depende en gran parte de la unión a proteínas de *scaffolding*, para lo cual es necesaria la dimerización. En esta línea, se ha reportado que la inhibición farmacológica de este proceso aumenta la señalización nuclear, en detrimento de la citosólica<sup>116</sup>. Una posible respuesta a esta pregunta podría radicar en la interacción de ERK con proteínas de anclaje. Poco se sabe acerca de la relación entre dimerización y transporte nuclear de ERK, aunque se conocen dos mecanismos de ingreso de ERK al núcleo: por transporte pasivo como monómero, o por transporte activo como dímero<sup>113,114</sup>. Burack et al.<sup>115</sup> encontró que frente a la estimulación con un agonista, ERK transloca rápidamente al núcleo de manera pasiva como monómero. Una hipótesis integradora para los resultados encontrados sobre la dimerización y fosforilación es que la disminución de la dimerización permite que haya un *pool* más grande de ERK fosforilado como monómero disponible para su rápida translocación al núcleo. Futuros experimentos que profundicen sobre la localización de ERK en la célula y la interacción con proteínas de *scaffolding* y sustratos tanto citosólicos como nucleares podrían esclarecer el mecanismo involucrado.

Respecto a la intervención con DEL-22379, luego de la reactivación de la memoria observamos un efecto bidireccional de la droga según el protocolo de entrenamiento usado ([figura R1.7](#), [figura R1.8](#)). Encontramos que la administración luego de la reactivación en animales entrenados con un shock fuerte es capaz de disminuir la dimerización

(reproduciendo a nivel bioquímico lo observado en animales entrenados con wIA) y, consecuentemente tiene un efecto detrimental sobre la reconsolidación de la memoria, reduciendo significativamente los tiempos de latencia ([figura R1.7](#)). Por otro lado, encontramos que la administración en el mismo punto temporal, pero para animales entrenados con un shock débil tiene un efecto facilitador de la reconsolidación, al incrementar la latencia de ingreso ([figura R1.8](#)). Si bien un efecto bidireccional de la droga no es algo sorprendente en sí mismo, ya que estamos hablando de memorias distintas que tienen dinámicas y requerimientos moleculares diferentes, el efecto encontrado en los animales entrenados con el shock débil abre nuevas preguntas. A pesar de que la reactivación de la memoria causa una disminución de la dimerización (figura R1.5, wIA), podemos descartar que el efecto observado se deba a que la administración de DEL disminuya aún más los niveles de dimerización (figura R1.8), ya que este tratamiento no tiene efecto en el punto temporal observado. Nuestra principal hipótesis de trabajo sostiene que la droga estaría actuando sobre eventos de dimerización que no hemos detectado luego de la reactivación de la memoria y que son relevantes para el desempeño en la tarea. Realizar más extractos en nuevos puntos temporales después de la reactivación nos permitiría establecer si hay otro evento de dimerización relevante en donde DEL podría estar teniendo un efecto que justifique lo observado en la conducta.

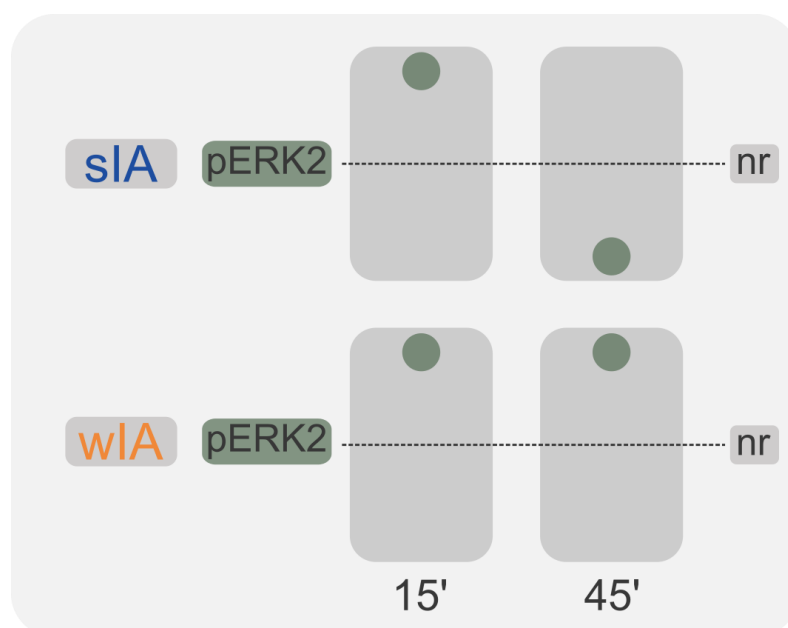
Para concluir, los resultados descritos nos permitirían sostener que la dimerización de ERK2 constituiría un mecanismo regulatorio relevante en procesos de plasticidad y memoria.

## Capítulo R2 - MKP3

En trabajos anteriores del laboratorio donde utilizamos esta misma tarea de evitación inhibitoria, se pudo describir la cinética de fosforilación de ERK2 en el citosol luego de la reactivación de la memoria<sup>145,146</sup>. Brevemente, encontramos que quince minutos después de la reactivación de la memoria, los animales re-expuestos presentan mayores niveles de fosforilación de ERK2 citosólica hipocampal comparados con sus controles no re-expuestos, independientemente de la intensidad del shock usado en el entrenamiento ([figura R2.1](#)). En cambio, cuarenta y cinco minutos después de la sesión de re-exposición, observamos una diferencia en la fosforilación dependiente de la intensidad del shock usado en el entrenamiento: mientras que aquellos animales que fueron entrenados con un shock débil presentan niveles elevados de fosforilación, los animales que fueron entrenados con el shock fuerte muestran una inhibición de la activación de la vía ([figura R2.1](#)).

La compleja regulación de la actividad de ERK1/2 está en parte dada por la actividad de las *dual specificity MAP kinase phosphatases* (MKPs), una familia de fosfatasas que proveen una red regulatoria negativa y puede actuar dando forma a la magnitud, temporalidad y espacialidad de la actividad de las MAP quinasas. Dentro de esta familia de fosfatasas, MKP3 es una fosfatasa de expresión exclusivamente citosólica y alta selectividad por ERK1/2, lo que la hace un blanco de particular interés para nuestro laboratorio.

Teniendo en cuenta los resultados previos del laboratorio, en este capítulo nos vamos a centrar en estudiar la actividad de MKP3 luego de la reactivación de la memoria.



**Figura R2.1 | Representación esquemática de los niveles de fosforilación de ERK2 citosólica hipocampal luego de la reactivación de la memoria de IA.** La línea punteada representa el nivel del grupo no reactivado, los círculos el nivel de pERK2 para los animales reactivados. Se representa en el plano superior lo observado

para sIA y en el inferior lo observado para wIA. Los animales entrenados con un shock fuerte presentan un aumento de la fosforilación de ERK2 15 minutos después de la reactivación de la memoria, y una inhibición 45 minutos. En cambio, los animales entrenados con un shock débil muestran un aumento significativo de la fosforilación 15 y 45 minutos después de la reactivación.

## R2.1 - Expresión de MKP3 luego de la reactivación de la memoria.

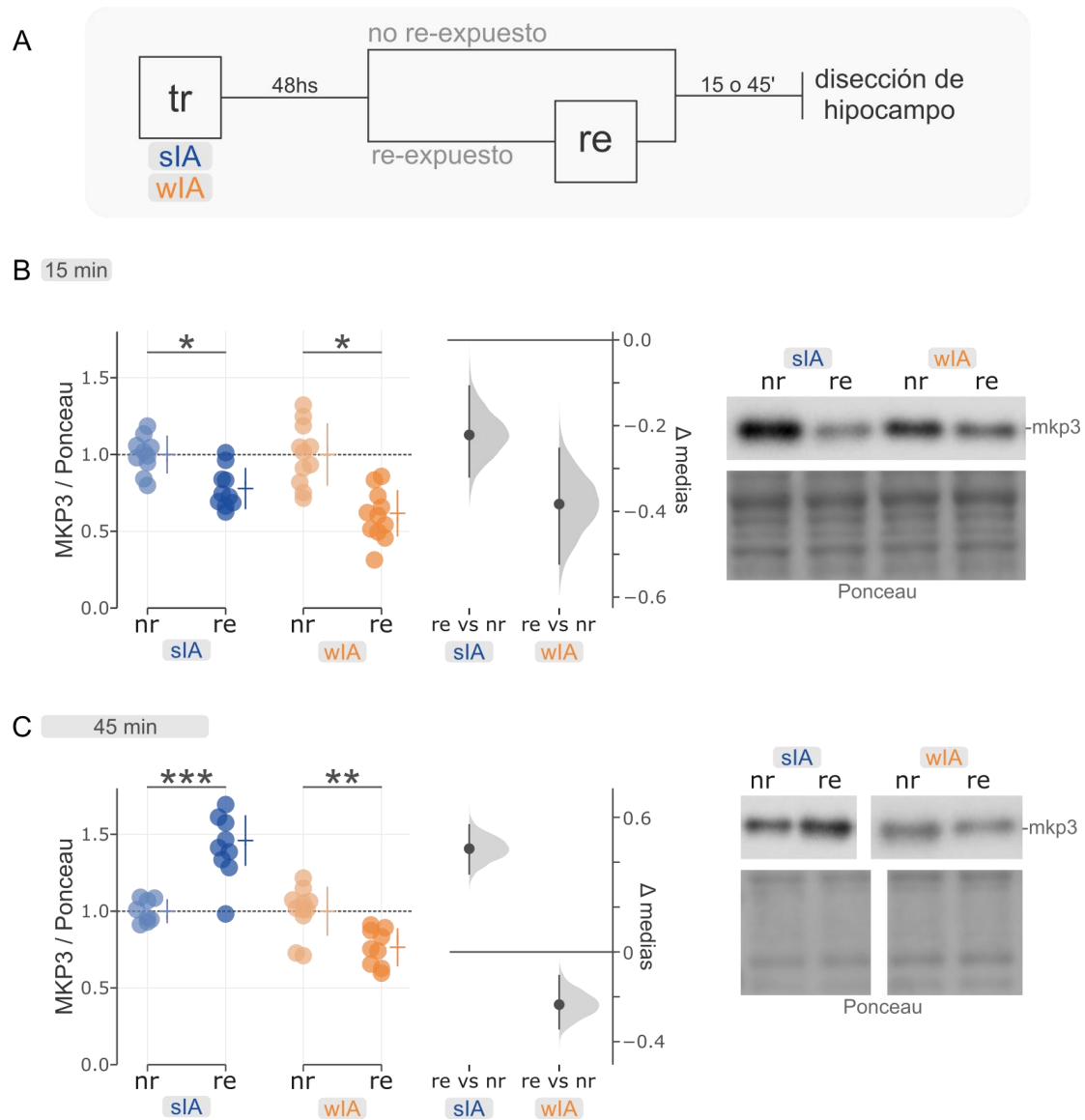
Con el objetivo de profundizar en los mecanismos regulatorios de la vía de ERK involucrados en la reconsolidación de la memoria de IA, nos preguntamos si hay una modulación de la expresión de MKP3 luego de la sesión de re-exposición. Entonces, en un primer experimento, entrenamos animales en la tarea de evitación inhibitoria y luego realizamos extractos de proteínas citosólicas 15 o 45 minutos después de la reactivación de la memoria con el objetivo de evaluar los niveles de expresión de MKP3 ([figura R2.2A](#)).

Como se observa en la [figura R2.2B](#), 15 minutos después de la sesión de re-exposición los animales del grupo re-expuesto presentan niveles de expresión de MKP3 significativamente menores que sus respectivos controles no re-expuestos, tanto en el caso del entrenamiento sIA (sIA-RE vs sIA-NR,  $p = 0.012$ ) como para el wIA (wIA-RE vs wIA-NR,  $p = 0.017$ ; [figura R2.2B](#)).

En contraste, 45 minutos después de la re-exposición, los niveles de expresión de MKP3 varían según la intensidad del shock usada en el entrenamiento ([figura R2.2C](#)). En el caso de entrenamiento sIA, los animales re-expuestos al contexto de entrenamiento presentan niveles de expresión de MKP3 significativamente mayores que sus controles no re-expuestos (sIA-RE vs sIA-NR,  $p < 0.001$ ; [figura R2.2C](#)). Por otro lado, los animales que fueron entrenados con wIA presentan niveles de expresión de MKP3 significativamente menores que los controles no re-expuestos (wIA-RE vs wIA-NR,  $p = 0.006$ ; [figura R2.2C](#)).

Estos resultados sugieren que MKP3 podría estar regulando la reconsolidación de la memoria de IA, actuando a través de la regulación de la fosforilación de ERK.





**Figura R2.2 | Niveles de expresión de MKP3 después de la reactivación de sIA y wIA.** (A) Protocolo experimental. Expresión de MKP3 quince (B) o cuarenta y cinco (C) minutos después de la re-exposición para animales entrenados con un shock fuerte (sIA) o débil (wIA) relativizada al control no re-expuesto. A la derecha se muestran bandas representativas de cada grupo y una porción de la membrana teñida con rojo Ponceau, usado como control de carga. El detalle estadístico completo se encuentra en la [tabla R2S1](#).  $n = 10-11$  / grupo.

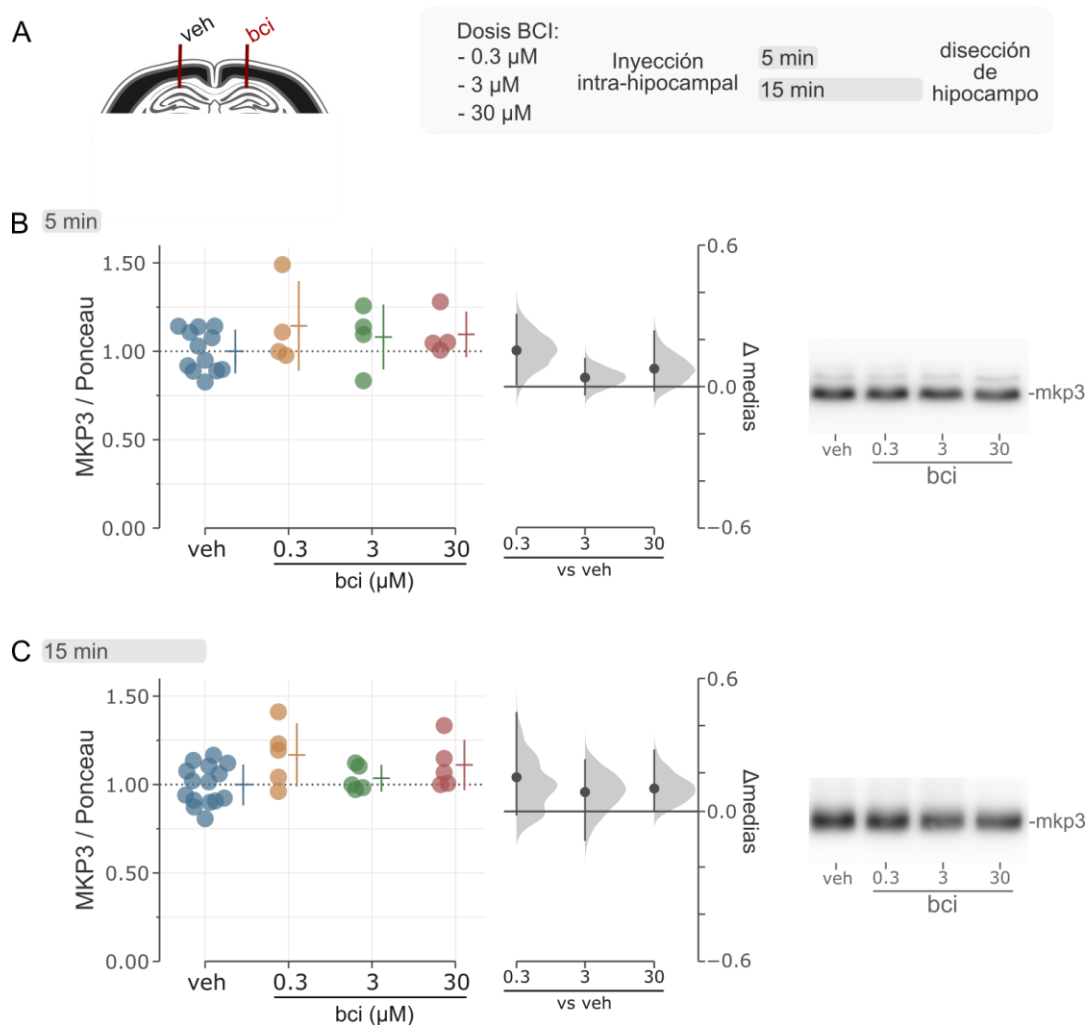
## R2.2 - Uso de BCI para inhibir la actividad de MKP3.

Con el objetivo de poder seguir investigando el rol de MKP3 en la reconsolidación de la memoria de IA, y habiendo observado una cinética diferencial en la expresión citosólica de MKP3 a los 45 min de la reactivación, decidimos evaluar si la actividad de MKP3 es un requisito para este proceso mnésico. Inicialmente debimos poner a punto la administración de BCI, una droga identificada originalmente en un screening *in vivo* usando *zebrafish*<sup>189</sup> como inhibidor de MKP3, y por consecuencia actuando como un regulador positivo de la actividad ERK/MAPK, al bloquear la actividad de la fosfatasa. Al momento de realizar los

experimentos no había trabajos previos que usaran esta droga en administrada de manera local en el cerebro de ratones, por lo que en un primer momento decidimos realizar un experimento para encontrar una dosis de BCI que induzca la activación de ERK en nuestro modelo.

Para esto inyectamos ratones *naïve* con distintas dosis de BCI (0.3  $\mu$ M, 3  $\mu$ M o 30  $\mu$ M) en un hemhipocampo, y vehículo en el otro. Cinco o quince minutos después de la inyección sacrificamos a los animales e hicimos extractos de proteínas hipocampales con el objetivo de determinar los niveles de expresión de MKP3, y de fosforilación de ERK ([figura R2.3A](#)).

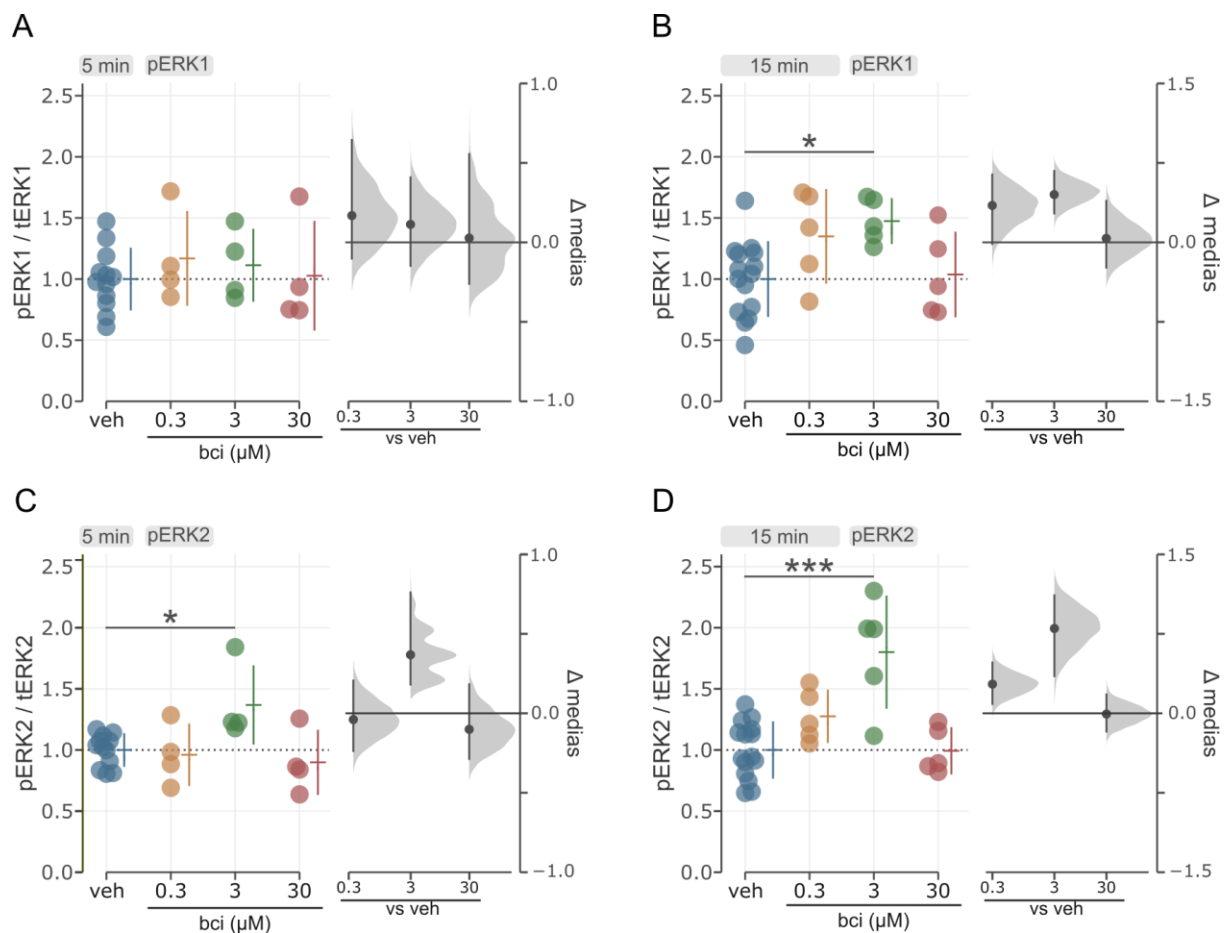
Observamos que ninguna dosis de BCI tuvo efecto sobre la expresión de MKP3 en los puntos temporales estudiados ([figura R2.3B y R2.3C](#)).



**Figura R2.3 | La administración de BCI no produce cambios en la expresión de MKP3 5 o 15 minutos después de su administración.** (A) Protocolo experimental. (B) Expresión de MKP3 cinco minutos después de la administración de BCI. (C) Expresión de MKP3 15 minutos después de la administración de BCI. El detalle estadístico completo se encuentra en la [tabla R2S2](#).

Sin embargo, la administración de BCI 3  $\mu\text{M}$  indujo un aumento significativo de la fosforilación de ERK2 a los 5 minutos comparado con el control inyectado con vehículo (pERK2: VEH vs BCI 3  $\mu\text{M}$ ,  $p = 0.022$ ; [figura R2.4C](#)) y no se observaron cambios para la activación de ERK1. Por otro lado, quince minutos después de la administración de BCI encontramos una activación significativa tanto de ERK1 como de ERK2 para la dosis de 3  $\mu\text{M}$  (pERK1: VEH vs BCI 3  $\mu\text{M}$ ,  $p = 0.027$ ; pERK2: VEH vs BCI 3  $\mu\text{M}$ ,  $p = 0.0001$ ; [figura R2.4B](#)).

Estos resultados sugieren que la dosis de 3  $\mu\text{M}$  de BCI es capaz de inducir la actividad de la vía de ERK/MAPK quince minutos después de su administración intra-hipocampal.



**Figura R2.4 | La administración intra-hipocampal de BCI induce la fosforilación de ERK1 y ERK2.** Se muestran los niveles de fosforilación de ERK1 (pERK1/tERK1) y ERK2 (pERK2/tERK2) de los extractos realizados en el experimento de la figura R2.3. Fosforilación de ERK1/2 relativizada al grupo vehículo 5 minutos (A y C) y 15 minutos (B y D) después de la administración de BCI. El detalle estadístico completo se encuentra en la [tabla R2S3](#).

## R2.3 - Administración de BCI después de la reactivación de sIA.

Habiendo encontrado una dosis efectiva para la inducción de la actividad de ERK2, y considerando la cinética de fosforilación de ERK2 durante la reconsolidación de la memoria de IA previamente descrita ([figura R2.1](#)), decidimos realizar un experimento para evaluar si el aumento de la actividad de ERK2 producto de la inhibición de MKP3 es capaz de modular la reconsolidación de la memoria de evitación inhibitoria.

Recapitulando resultados previos, encontramos animales entrenados con un entrenamiento débil (wIA) muestran un aumento significativo de la actividad de ERK2 45 minutos después de la reactivación de la memoria, y que la inhibición farmacológica de la actividad de ERK2 en este punto temporal causa un aumento en la latencia de ingreso cuando los animales son evaluados 24 horas después, teniendo este grupo latencias de entrada similares a las que presentan los animales entrenados con un shock fuerte (sIA).

Haciendo un 'espejo' de este experimento, y sabiendo que los animales entrenados con un shock fuerte muestran una disminución de la fosforilación de ERK2, nos preguntamos si aumentar la actividad de ERK2 por medio de la administración de BCI después de la reactivación, afectaría la reconsolidación de la memoria, produciendo una disminución en la latencia de ingreso en la sesión de evaluación.

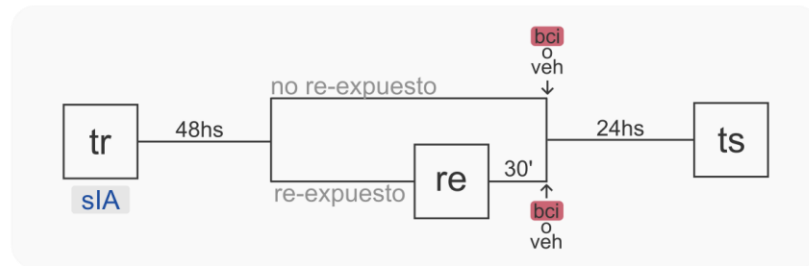
Para responder esta pregunta entrenamos animales con un sIA. Cuarenta y ocho horas después, la mitad de los animales fueron re-expuestos y la otra mitad se mantuvieron en su jaula de cría. Treinta minutos después de la re-exposición (o en los tiempos correspondientes para los animales no re-expuestos), inyectamos a los animales con BCI 3  $\mu$ M o vehículo. Así, los grupos experimentales quedaron conformados de la siguiente manera: RE+BCI, RE+VEH, NR+BCI y NR+VEH.

Como se puede observar en la [figura R2.5](#), al evaluar el efecto de la administración de BCI luego de la reactivación de la memoria, encontramos que los animales del grupo RE+BCI muestran latencias de ingreso significativamente menores que los RE+VEH (RE+BCI vs RE+VEH,  $p = 0.005$ ; [figura R2.5](#)), mientras que no detectamos diferencias en los animales que no pasaron por la sesión de reactivación (NR+BCI vs NR+VEH,  $p = 0.974$ ), lo que indica que este impedimento es específico de la reactivación y labilización de la memoria.

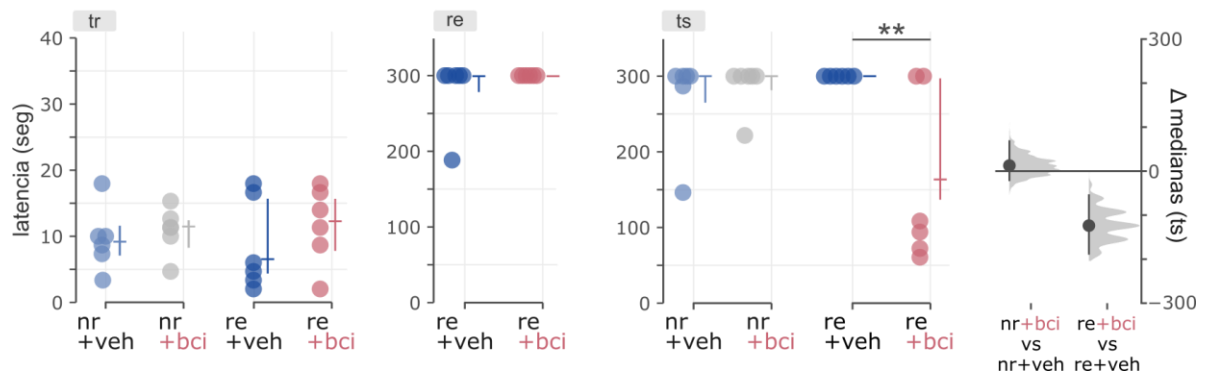
Estos resultados sugieren que aumentar la actividad de ERK en el hipocampo mediante la administración de BCI causa un deterioro en la reconsolidación de la memoria de los animales entrenados con un sIA, aportando evidencia a la propuesta que la regulación

de la actividad de ERK por medio de MKP3 constituye un mecanismo esencial para la reconsolidación de la memoria de IA.

A



B **sIA**



**Figura R2.5 | La administración de BCI luego de la reactivación de una memoria fuerte (sIA) causa un impedimento en su reconsolidación.** A) Protocolo experimental. B) Latencia de ingreso al compartimento oscuro durante el entrenamiento (tr), la reactivación (re) y la evaluación (ts). Se grafica la mediana y el rango intercuartil. El detalle estadístico completo se encuentra en la [tabla R2S4](#). n = 6 animales / grupo.

## Capítulo R2 – Discusión

En este capítulo estudiamos el rol de la fosfatasa MKP3 en la reconsolidación de la memoria de evitación inhibitoria. Como se mencionó en la introducción, esta fosfatasa se expresa exclusivamente en el citosol y es altamente selectiva para ERK, sin mostrar actividad catalítica significativa sobre otras quinasas de la familia. Estas propiedades hacen de MKP3 un candidato de especial interés para estudiar los mecanismos de regulación de ERK, en especial en procesos dependientes de la localización subcelular de esta quinasa.

En este sentido, los resultados de este capítulo se apoyan en resultados previos del laboratorio, que dan cuenta de la importancia de la actividad de ERK en el citosol tras la reactivación de la memoria. Nuestro laboratorio encontró que en esta tarea la actividad de ERK2 varía según el protocolo de entrenamiento usado. Al analizar la actividad de ERK2 en el hipocampo quince minutos después de la reactivación de la memoria, se observó un aumento significativo de la fosforilación de ERK2 en el citosol de animales entrenados tanto en wIA como sIA. Sin embargo, cuarenta y cinco minutos después de la reactivación, el nivel de activación de la quinasa difería según el tipo de entrenamiento. Los animales entrenados con un shock débil mostraron un aumento en la fosforilación de ERK2, mientras que en los animales entrenados con un shock fuerte se observó una inhibición de la misma<sup>146</sup>.

Estos resultados van en línea con los presentados en esta tesis (figura R2.2). Quince minutos después de la re-exposición observamos una disminución significativa de la expresión de MKP3 tanto para animales entrenados con un shock fuerte como con uno débil, consistente con la observación de niveles elevados de pERK2 previamente reportados por nuestro laboratorio<sup>146</sup>. En contraste, a los cuarenta y cinco minutos de la reexposición, los animales entrenados con un shock fuerte mostraron un aumento significativo en la expresión de MKP3, mientras que aquellos entrenados con un shock débil presentaron una inhibición en comparación con sus respectivos controles. En resumen, y de acuerdo con lo esperado, la fosfatasa MKP3 muestra una cinética inversa a la actividad de ERK2.

Para el abordaje farmacológico del estudio de procesos de memoria y los mecanismos moleculares que están involucrados es fundamental contar con fármacos que modulen (negativa y positivamente) la actividad de los blancos farmacológicos a estudiar. Mientras que se han desarrollado múltiples inhibidores de la actividad de la vía de ERK, hasta el momento no contábamos con moduladores positivos de la misma. Si bien se ha reportado que diversos agentes farmacológicos (agonistas dopaminérgicos<sup>190</sup>, agonistas y antagonistas del receptor nicotínico  $\alpha 7$ <sup>191</sup>, agonistas  $\beta$ -adrenérgicos<sup>192</sup> o faloidina<sup>193</sup> entre otros) pueden inducir la activación de ERK también afectan otras vías de señalización.

Esto complica la interpretación de los resultados, ya que el efecto observado podría deberse tanto a la inducción de ERK como a la influencia sobre otras quinasas, receptores o blancos moleculares. En este sentido, nos propusimos estudiar el rol de BCI, un inhibidor alostérico de MKP3, que podría constituir una herramienta útil para futuros estudios de la actividad de ERK en procesos de memoria y aprendizaje, ya que actuaría específicamente sobre esta quinasa (y en particular, en su localización citosólica).

Al momento de realizar los experimentos no encontramos publicaciones que administren esta droga en el cerebro de ratones, por lo que primero diseñamos un experimento con el objetivo de poner a punto la dosis. Para esto inyectamos ratones *naïve* en el hipocampo con distintas dosis de BCI (0.3  $\mu$ M, 3  $\mu$ M o 30  $\mu$ M) en un hemisferio y con vehículo en el otro ([figura R2.3](#)). Encontramos que la administración de BCI no produce cambios en la expresión de MKP3 cinco o quince minutos después ([figura R2.3](#)). Sin embargo, al analizar la actividad de ERK, detectamos un aumento significativo en la fosforilación de ERK1 y ERK2 quince minutos después de inyectar la dosis de 3  $\mu$ M ([figura R2.4](#)). Estos resultados sugieren que BCI podría actuar como un regulador positivo de ERK, aunque deben considerarse algunas limitaciones.

Primero, solo medimos la activación de ERK; aunque MKP3 muestra alta selectividad por ERK, no podemos descartar efectos sobre otras quinasas de la familia MAPK, como JNK o p38<sup>194,195</sup>. Sería útil realizar experimentos adicionales para medir la fosforilación de estas proteínas. Otra limitación es que BCI podría también afectar a MKP1<sup>196</sup>, una fosfatasa nuclear con mayor selectividad por JNK, aunque también capaz de defosforilar a ERK. Aunque BCI parece prometedor como herramienta para regular la actividad de ERK, es evidente la necesidad de realizar más experimentos que confirmen su especificidad.

Retomando los resultados previos del laboratorio, sabemos que la administración de PD98059 (un inhibidor de la fosforilación de ERK) cuarenta y cinco minutos después de la re-exposición en animales entrenados con un shock débil aumenta la latencia de entrada en la sesión de evaluación, haciendo que estos animales se comporten de manera similar a los entrenados con un shock fuerte, en quienes se observa una disminución significativa de la actividad de ERK2 citosólica en el hipocampo.

Con este antecedente, planteamos un experimento ‘espejo’ para evaluar si el aumento de la actividad de ERK2 en el hipocampo mediante la administración de BCI, cuarenta y cinco minutos después de la reactivación en animales entrenados con un shock fuerte (que presentan una disminución de fosforilación de ERK2 en este punto temporal),



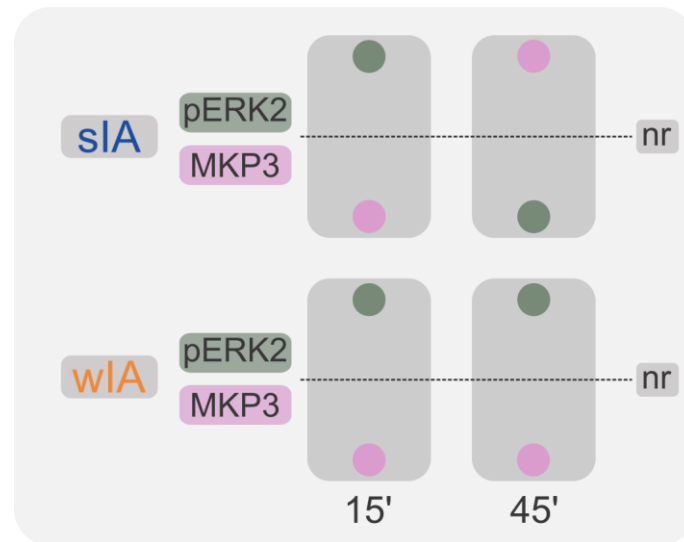
afectaría la conducta, haciendo que estos animales se comporten como si hubieran sido entrenados con un shock débil.

Efectivamente, en el experimento mostrado en la [figura R2.5](#), encontramos que la administración de BCI luego de la re-exposición en el hipocampo de animales entrenados con un shock fuerte causa una disminución en la latencia de ingreso al compartimento oscuro en la sesión de evaluación, mostrando latencias similares a las que se observan en animales entrenados con un shock débil.

Más allá de lo mencionado anteriormente sobre la especificidad de la droga, aún queda repetir este experimento y medir los niveles de actividad de ERK2 luego de la administración de BCI y la re-exposición. Esto aportaría más evidencia respecto de que el cambio conductual observado se debe a un aumento en la actividad de ERK provocado por la manipulación farmacológica.

Si bien era posible que esta fosfatasa cumpla un rol en la conducta, ya que en última instancia regula la actividad de ERK en el sistema nervioso<sup>197</sup>, estos resultados serían los primeros en sustentar un rol de MKP3 en el hipocampo en procesos de memoria. En línea con nuestras hipótesis, recientemente se encontró que ratones expuestos de manera crónica al consumo de alcohol presentan un aumento de la expresión de MKP3 en la corteza prefrontal, asociado a una disminución de BDNF en esta misma área. Estos animales además presentan un déficit en la memoria de reconocimiento de objeto novedoso. La administración de BCI en la corteza prefrontal rescata el déficit en la tarea y la señalización de ERK/BDNF<sup>198</sup>.

El rol de las fosfatasas de la familia de las MKPs en la regulación de la actividad de las MAPK, y en particular de MKP3 en la modulación de ERK en el citosol da cuenta de la importancia del estudio de éstas en procesos de plasticidad y memoria. En la [figura R2.6](#) mostramos un esquema actualizado que resume los resultados encontrados en este trabajo sobre la dinámica de MKP3 luego de la re-activación de la memoria de IA, y los integra con lo descripto anteriormente en nuestro laboratorio.



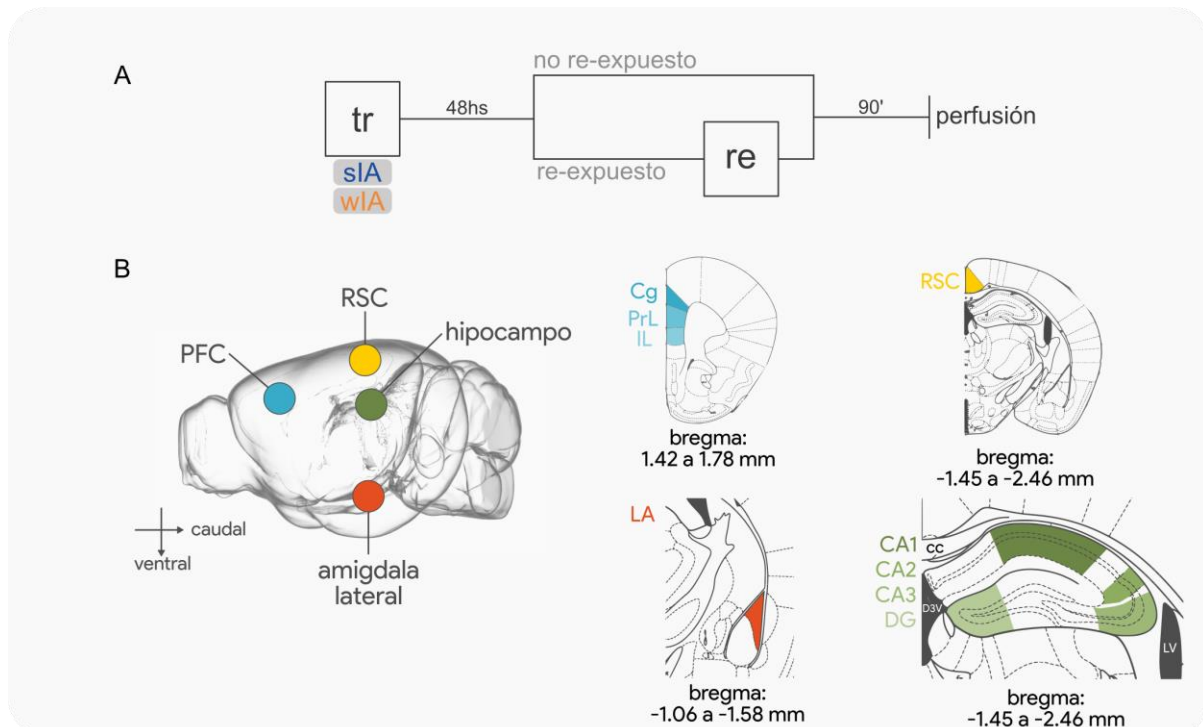
**Figura R2.6 | Representación esquemática de los niveles de fosforilación de ERK2 y expresión de MKP3 hipocampal luego de la reactivación de la memoria de IA.** Los resultados expuestos en este capítulo complementan los reportes previos del nuestro laboratorio, en donde se caracterizó la cinética de ERK2 luego de la reactivación de la memoria (esquemático en la [figura R2.1](#)). Encontramos que la expresión de MKP3 sigue una cinética inversa a la de la fosforilación de ERK2. Los círculos representan la actividad de pERK2 (verde) y MKP3 (rosa) para animales re-expuestos en los tiempos indicados (15 y 45 minutos). La línea punteada representa los niveles encontrados para animales no reactivados

## Capítulo R3 - c-Fos

### R3.1 - Cambios en la expresión de c-Fos luego de la reactivación de la memoria de evitación inhibitoria.

Es ampliamente aceptado que las memorias se codifican en circuitos neuronales que forman la traza mnésica (o engramas) dispersos en diversas áreas del cerebro<sup>41,199</sup>, y para varias tareas comportamentales éstos se han identificado en distintas áreas cerebrales como el hipocampo, la amígdala y la corteza prefrontal, entre otras. Para comprender cómo se integran los distintos ensambles neuronales involucrados en el aprendizaje y la memoria se requieren técnicas y enfoques que aporten una mirada integral de lo que sucede en el cerebro durante estos procesos.

Los estudios realizados en nuestro laboratorio se centran principalmente en el rol hipocampo durante distintos procesos mnésicos de la tarea de evitación inhibitoria, usando abordajes farmacológicos para modular distintas vías moleculares en ésta área<sup>32,146,200</sup>. En este capítulo presentaremos resultados iniciales que apuntan a caracterizar la participación de distintas áreas del cerebro (hipocampo, amígdala lateral, corteza pre-frontal y corteza retrosplenial) en la reconsolidación de esta memoria, tanto en la versión que usa un shock débil en el entrenamiento (wIA), como la que usa un shock fuerte (sIA). Si bien se han desarrollado diversas técnicas que permiten este tipo de estudios, decidimos encarar este trabajo preliminar usando la técnica de inmunohistoquímica contra el IEG c-Fos, considerado como un marcador de actividad neuronal<sup>88,89</sup>. Brevemente, entrenamos a dos grupos con un shock débil o fuerte (wIA o sIA respectivamente), y cuarenta y ocho horas después seleccionamos aleatoriamente a la mitad de los animales de cada uno de los grupos y los re-expusimos a la plataforma. Noventa minutos después de la sesión de re-exposición perfundimos a los animales y disecamos el cerebro ([figura R3.1A](#)).

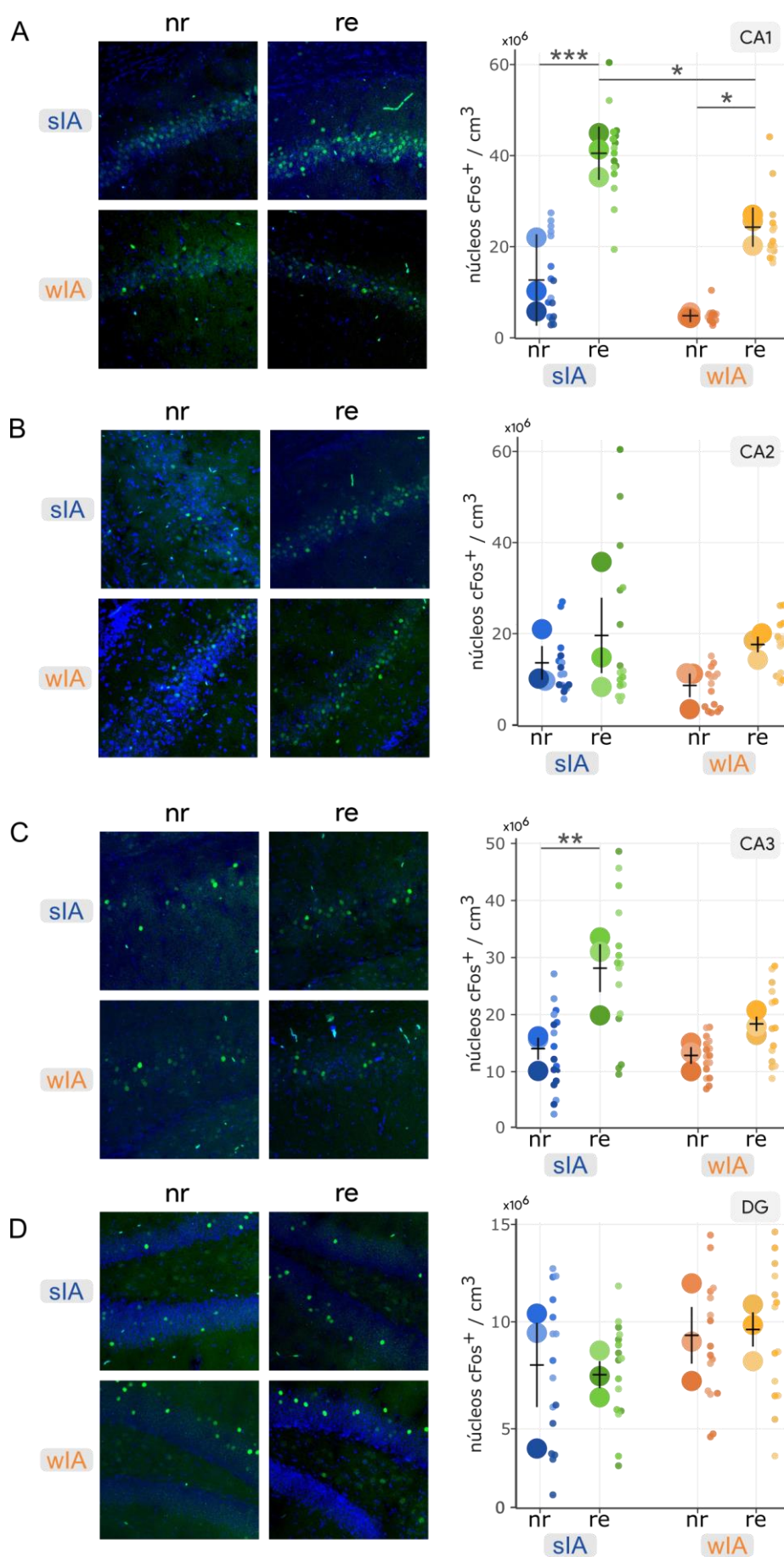


**Figura R3.1 | Identificación de áreas cerebrales activadas luego de la reactivación de la memoria de evitación inhibitoria.** (A) Protocolo experimental. (B) Esquema de las áreas de interés estudiadas. Se consigna el rango con respecto al bregma en el eje antero-posterior que se tuvo en cuenta a la hora de tomar las imágenes. PFC = Corteza Prefrontal, RSC = Corteza Retrosplenial, LA = Amígdala Lateral, Cg = Corteza Anterior Cingulada, PrL = Corteza Prelímbica, IL = Corteza Infralímbica.

### R3.2 - Hipocampo.

En primer lugar, decidimos evaluar la expresión de c-Fos luego de la reactivación de la memoria en las distintas subregiones que conforman al hipocampo (CA1, CA2, CA3 y DG). Como se puede observar en la [figura R3.2A](#) encontramos que luego de la reactivación de la memoria hay un aumento de la expresión de c-Fos en la subregión CA1 para animales entrenados tanto con un shock débil (wIA-RE vs wIA-NR,  $p = 0.009$ ; [figura R3.2A](#)) como con un shock fuerte (sIA-RE vs sIA-NR,  $p = 0.0010$ ; [figura R3.2A](#)). Además, encontramos que la expresión de c-Fos luego de la reactivación de la memoria fue significativamente mayor para el grupo entrenado con un shock fuerte comparado con el entrenado con el shock débil (sIA-RE vs wIA-RE,  $p = 0.023$ , [figura R3.2A](#)).

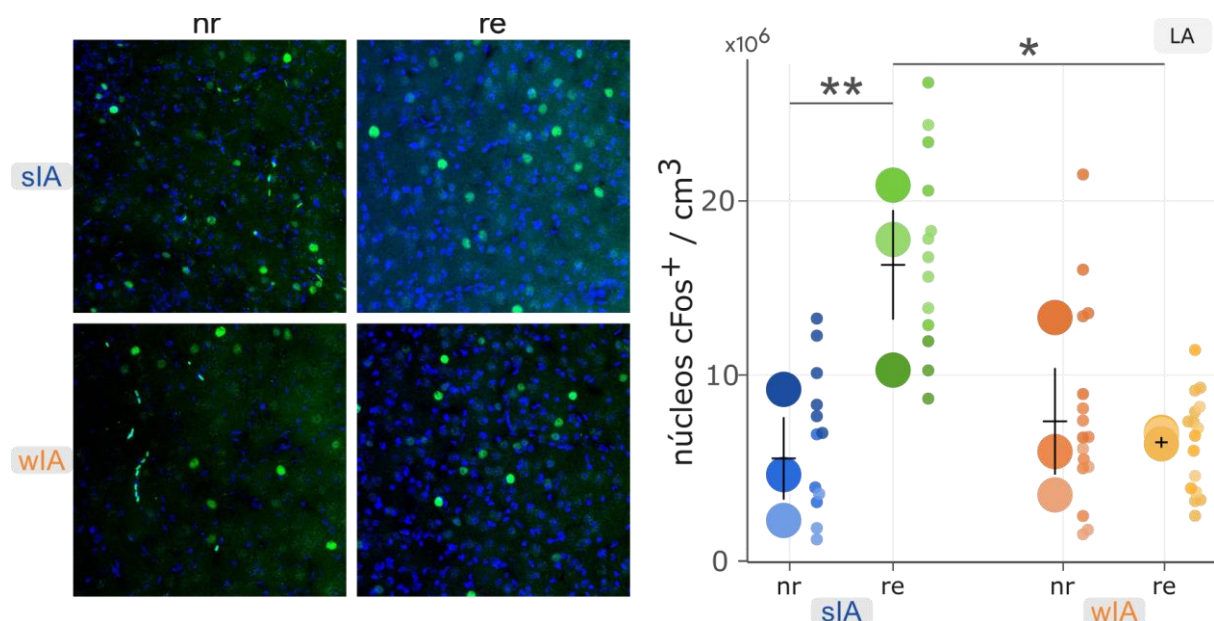
Para la subregión CA3 encontramos diferencias producto de la reactivación de la memoria solamente para los animales que fueron entrenados con un shock fuerte (sIA-RE vs sIA-NR,  $p = 0.016$ ; wIA-RE vs wIA-NR,  $p = 0.468$ ; [figura R3.2C](#)). Por último, para las regiones CA2 y DG no encontramos diferencias como consecuencia de la reactivación para ninguno de los protocolos de entrenamiento usados.



**Figura R3.2 | Actividad inducida en el hipocampo por la reactivación de la memoria de IA.** Se muestran imágenes representativas y cuantificación de células c-Fos<sup>+</sup> en (A) CA1, (B) CA2, (C) CA3 y (D) DG. Los puntos grandes representan la densidad de células c-Fos<sup>+</sup> media de cada animal, y los chicos la de cada imagen obtenida. Las barras de error muestran la media y el desvío estándar. El detalle estadístico se encuentra en la [tabla R3S1](#). n = 12-16 imágenes provenientes de 3 ratones por grupo.

### R3.3 - Amígdala Lateral.

Para continuar con la caracterización de las áreas involucradas en la reconsolidación de la memoria, seleccionamos a la amígdala como área de interés, debido a su bien establecido rol en diversos tipos de memorias<sup>201-203</sup>. Para esta área encontramos que hay un aumento significativo de la expresión de c-Fos luego de la re-exposición para los animales entrenados con el shock fuerte (sIA-NR vs sIA-RE,  $p = 0.013$ ; [figura R3.3](#)). Este aumento es específico del entrenamiento con shock fuerte, ya que no encontramos diferencias producto de la re-exposición para los animales entrenados con el shock débil (wIA-NR vs wIA-RE,  $p = 0.722$ ; [figura R3.3](#)).



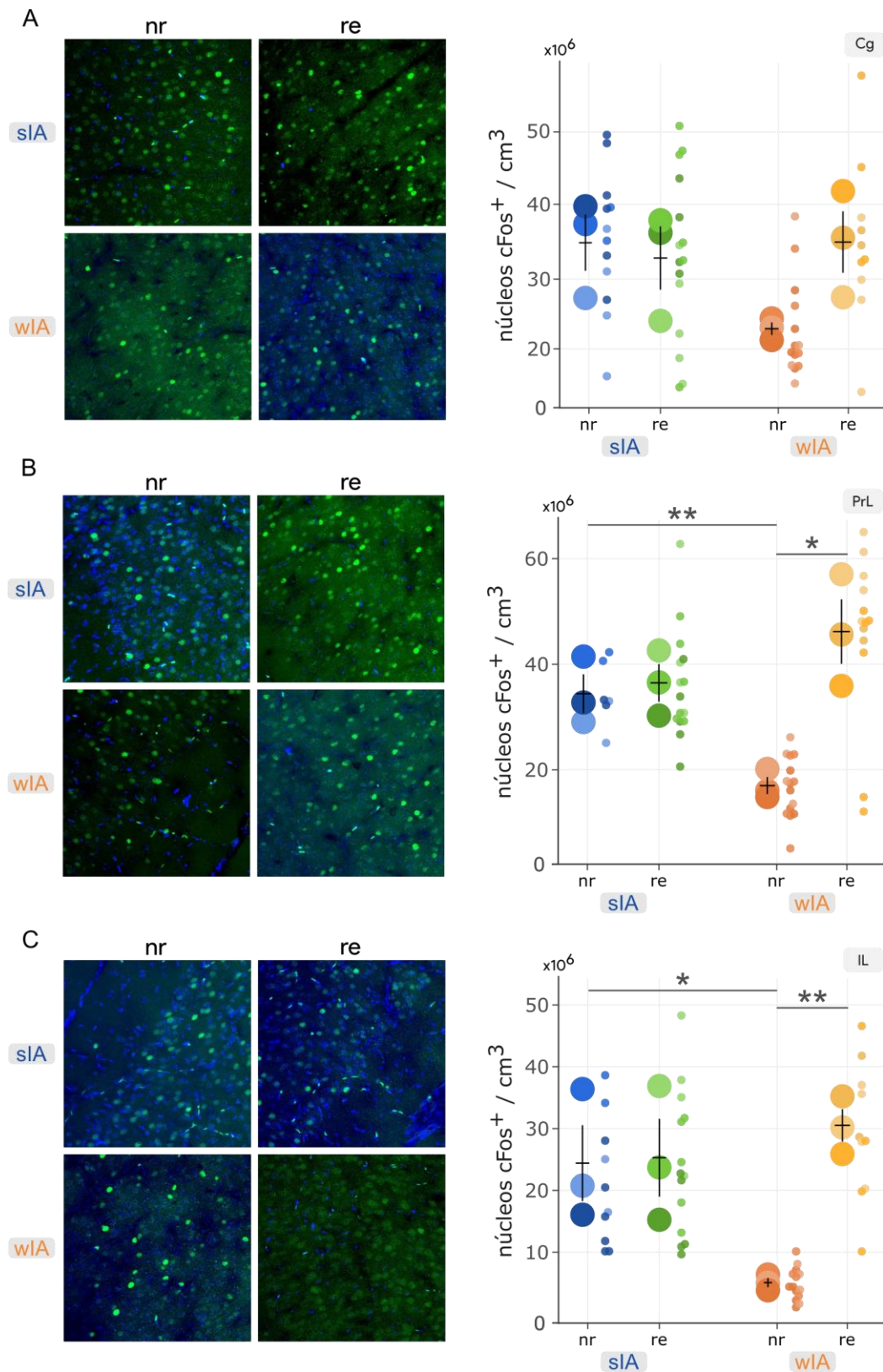
**Figura R3.3 | Actividad inducida en la amígdala lateral por la reactivación de la memoria de IA.** Se muestran imágenes representativas y cuantificación de células c-Fos<sup>+</sup> en la amígdala lateral. Los puntos grandes representan la densidad de células c-Fos<sup>+</sup> media de cada animal, y los chicos la de cada imagen obtenida. Las barras de error muestran la media y el desvío estándar. El detalle estadístico se encuentra en la [tabla R3S2](#). n = 12-17 imágenes provenientes de 3 ratones por grupo.

### R3.4 - Corteza Prefrontal.

La corteza prefrontal puede ser dividida en distintas subregiones cada una asociada con diferentes funciones cognitivas, así que, para abordar el rol de esta corteza en la reconsolidación de la memoria de IA, decidimos tomar por separado imágenes de cada una de las siguientes subregiones: corteza anterior cingulada (Cg), corteza prelímbica (PrL) y corteza infralímbica (IL). Tanto para la PrL como para la IL encontramos un aumento significativo de núcleos con marca de c-Fos producto de la reactivación solamente para los animales entrenados con un shock débil (PrL: wIA-NR vs wIA-RE,  $p = 0.001$ ; sIA-NR vs sIA-RE,  $p = 0.778$ ; IL: wIA-NR vs wIA-RE,  $p = 0.004$ ; sIA-NR vs sIA-RE,  $p = 0.808$ ; [figura R3.4A](#)).

Para estas dos áreas también encontramos una activación diferencial producto de la intensidad del shock usado en el entrenamiento (PrL: wIA-NR vs sIA-NR,  $p = 0.022$ ; IL: wIA-NR vs sIA-NR,  $p = 0.021$ ; [figura R3.4A](#)). Para la Cg, si bien parece seguir la misma tendencia, no encontramos diferencias estadísticas significativas ([figura R3.4A](#)).

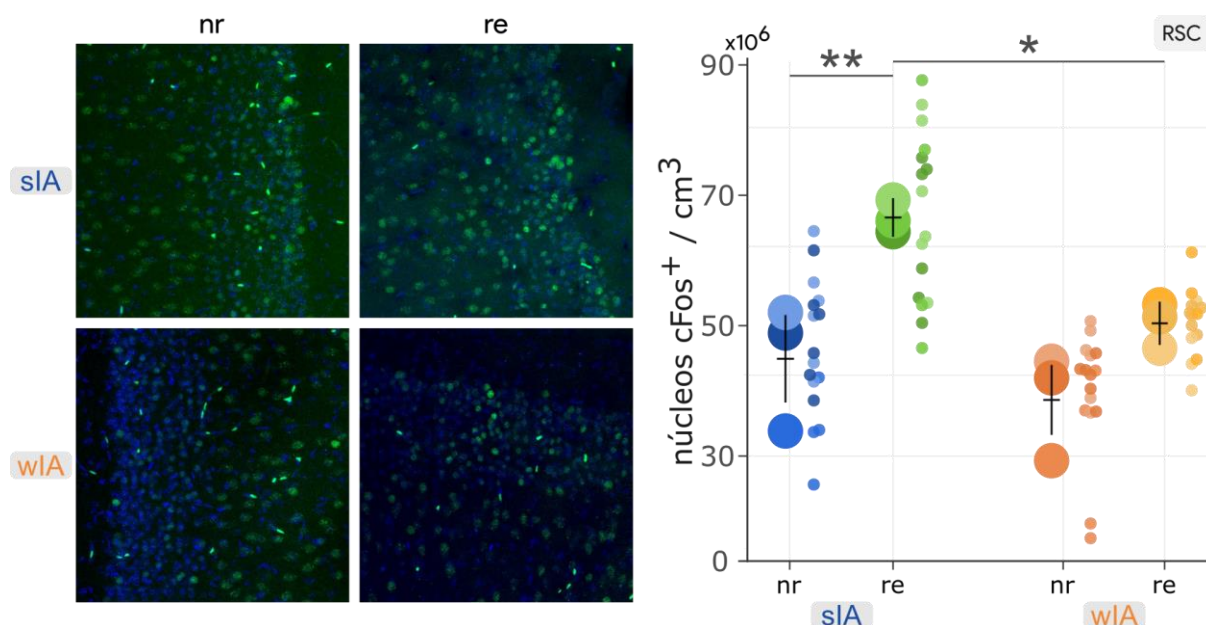




**Figura R3.4 | Actividad inducida en la corteza prefrontal por la reactivación de la memoria de IA.** Se muestran imágenes representativas y cuantificación de células c-Fos<sup>+</sup> en (A) Cg, (B) PrL e (C) IL. Los puntos grandes representan la densidad de células c-Fos<sup>+</sup> media de cada animal, y los chicos la de cada imagen obtenida. Las barras de error muestran la media y el desvío estándar. El detalle estadístico se encuentra en la [tabla R3S3](#). n = 7-13 imágenes provenientes de 3 ratones por grupo).

### R3.5 - Corteza Retrosplenial.

Por último, decidimos estudiar la participación de la corteza retrosplenial (RSC), que ha sido asociada previamente con distintos tipos de memoria, incluyendo la memoria de IA<sup>204–208</sup>. Encontramos que esta región muestra un aumento de la densidad de células cFos<sup>+</sup> después de la reactivación cuando los animales fueron entrenados con un shock fuerte (sIA-NR v sIA-RE,  $p = 0.004$ ; [figura R3.5](#)). En cambio, no encontramos diferencias significativas en la actividad de RSC como producto de la reactivación cuando los animales fueron entrenados con un shock débil (wIA-RE vs wIA-NR,  $p = 0.064$ ; [figura R3.5](#)).



**Figura R3.5 | Actividad inducida en la corteza retrosplenial por la reactivación de la memoria de IA.**

Se muestran imágenes representativas y cuantificación de células c-Fos<sup>+</sup> en RSC. Los puntos grandes representan la densidad de células c-Fos<sup>+</sup> media de cada animal, y los chicos la de cada imagen obtenida. Las barras de error muestran la media y el desvío estándar. El detalle estadístico se encuentra en la [tabla R3S4](#).  $n = 13-17$  imágenes provenientes de 3 ratones por grupo).

## Capítulo R3 - Discusión

Está ampliamente aceptado que las memorias no se encuentran representadas en células únicas, sino en ‘engramas’. Estos conjuntos de neuronas que se activan coordinadamente producto de una experiencia se encuentran ampliamente distribuidos en múltiples áreas del cerebro. Esta naturaleza distribuida de la representación neuronal de la experiencia ha hecho difícil definir de manera taxativa las áreas involucradas en distintos tipos o procesos de memoria. Si bien los experimentos farmacológicos, electrofisiológicos y de lesión han aportado mucho a la identificación de áreas cerebrales involucradas en el procesamiento de memorias específicas, estos enfoques comparten la misma limitación: solamente ofrecen una visión limitada y circunscripta anatómicamente de procesos que son globales y distribuidos.

En este capítulo, cuantificamos la expresión de la proteína c-Fos con el objetivo de detectar cambios en la actividad de múltiples áreas cerebrales como producto de la reactivación de la memoria de evitación inhibitoria. Usamos grupos de animales entrenados con un shock débil (wIA) o fuerte (sIA), además de sus respectivos controles que no pasaron por la reactivación de la memoria (wIA-NR y sIA-NR).

La importancia del hipocampo en la reconsolidación de la memoria de evitación inhibitoria ya ha sido estudiada en nuestro laboratorio en ocasiones anteriores, ya que esta región ha sido el blanco de múltiples experimentos farmacológicos <sup>146,150,209–212</sup>.

En base a la arquitectura y amplia conectividad del hipocampo, estudios conductuales han demostrado que las diferentes subregiones (CA1, CA2, CA3 y DG) que lo componen pueden estar involucradas en funciones cognitivas <sup>revisado en 213</sup>. Además, varios trabajos han demostrado que el rol de cada una de dichas subregiones hipocampales en el sostenimiento de procesos mnésicos puede ser disociado funcionalmente mediante abordajes experimentales<sup>214–221</sup>. En este sentido, nos propusimos evaluar la activación de distintas subregiones del hipocampo (CA1, CA2, CA3 y DG) luego de la reactivación de la memoria de evitación inhibitoria.

Los resultados presentados en este capítulo expanden las observaciones previas del laboratorio sobre la participación del hipocampo en la reconsolidación de esta tarea.

Encontramos un aumento significativo en la cantidad de células que expresan c-Fos luego de la reactivación de la memoria en CA1, tanto para animales entrenados con un shock fuerte como con un shock débil ([figura R3.2A](#)). En este sentido, nuestros resultados van en línea con los numerosos trabajos que sostienen la importancia de esta subregión del hipocampo en la reconsolidación de la memoria.

Continuando con la descripción de las distintas subregiones del hipocampo, encontramos que la reactivación de la memoria no induce un aumento de la expresión de c-Fos en CA2, independientemente del protocolo de entrenamiento usado ([figura R3.2B](#)). Estos resultados también se alinean con la bibliografía conocida, ya que el rol de esta región en roedores está típicamente asociado a conductas y memorias sociales<sup>222–226</sup>, y no memorias aversivas como la que estudiamos en este trabajo.

Con respecto a CA3 ([figura R3.2C](#)), encontramos una regulación diferencial de la expresión de c-Fos. Los animales entrenados con un shock fuerte (sIA) mostraron un aumento de células c-Fos<sup>+</sup> como producto de la reactivación de la memoria, mientras que no detectamos cambios cuando utilizamos un shock débil. Modelos computacionales sugirieron que esta subregión estaría preferentemente involucrada en la precisión con la que se recuperan las memorias<sup>227</sup>. Si bien esta hipótesis no se comprobó experimentalmente, el hecho de que la recuperación de memorias remotas (asociadas a menor precisión en el recuerdo) dejan de inducir actividad en CA3<sup>228</sup>, y que cuando se silencia esta región usando optogenética durante la recuperación de la memoria de miedo contextual disminuye la precisión de la misma (los animales dejan de recordar el contexto en el que recibieron el shock)<sup>229</sup>, sugiere que efectivamente esta subregión podría regular la precisión de las memorias recuperadas. En este sentido, podríamos pensar que la actividad diferencial que nosotros observamos en CA3 podría deberse a que, al usar un estímulo más saliente en los animales entrenados con un shock fuerte, esta es recuperada de manera más precisa en la sesión de reactivación, dando lugar a el aumento de células c-Fos<sup>+</sup> en CA3, que no encontramos en los animales que fueron entrenados con el shock débil.

En lo que refiere al DG, no encontramos diferencias producto de la sesión de re-exposición para ninguno de los dos protocolos de entrenamiento utilizados. El rol de esta región durante la evocación de la memoria es discutido. Por un lado, se encontró que inhibir la actividad de esta región no tiene efecto sobre la expresión de memorias<sup>230–233</sup>. Sin embargo, otros trabajos mostraron que la activación optogenética del engrama en el DG es suficiente para inducir la evocación de la memoria<sup>69,70,234</sup>. Si bien estos resultados sugieren un rol del DG en la evocación, no prueban que el DG esté involucrado en la recuperación cuando la memoria es evocada por un recordatorio, y no por la activación optogenética del engrama. En este sentido, es esperable que la sesión de reactivación que usamos en nuestro protocolo experimental no induzca actividad en DG.

En la tarea de condicionamiento de miedo contextual se propone que uno de los roles del hipocampo es generar representaciones contextuales capaces de evocar la expresión del miedo por medio de conexiones amígdalo-hipocampales. Trabajos del grupo de LeDoux mostraron que la lesión de la amígdala lateral (LA) causa déficits en la adquisición y evocación de memorias de evitación<sup>235-237</sup>. Otros grupos, usando tratamientos farmacológicos, también encontraron que la amígdala tiene un rol central en distintas etapas de la tarea de evitación inhibitoria<sup>238-240</sup>. En esta línea, encontramos que un aumento de las células c-Fos<sup>+</sup> producto de la reactivación de la memoria solamente para el grupo de animales que fue entrenado con un shock fuerte. Por otro lado, la reactivación no indujo cambios en esta área cuando los animales fueron entrenados con un shock débil.

Varios estudios en humanos y primates no humanos reportaron que la amígdala codifica la intensidad o proximidad del miedo percibido, o del estímulo aversivo usado<sup>241-245</sup>. En este sentido, la ausencia de actividad indicada por células c-Fos<sup>+</sup> observada después de la reactivación de la memoria de animales entrenados con el shock débil, podría deberse a que la aversión percibida por el animal, evidenciada por la latencia de ingreso, es considerablemente menor que la de los animales entrenados con el shock fuerte. Otra consideración a tener en cuenta es que la amígdala es una estructura compleja y muy heterogénea anatómica y funcionalmente, de la cual se reconocen tres subnúcleos principales: la amígdala basolateral (conformada por la amígdala basal y la amígdala lateral), la amígdala central, y la amígdala medial<sup>201</sup>. Teniendo esto en cuenta, nosotros cuantificamos la expresión de c-Fos en la amígdala lateral, así que no podemos descartar que en los animales entrenados con un shock débil no se esté induciendo la actividad de otra subregión de la amígdala producto de la reactivación de la memoria.

El rol de la corteza retrosplenial ha sido ampliamente descrito en memorias episódicas<sup>204</sup>, aprendizaje espacial<sup>205</sup> y en memorias aversivas<sup>206,246-250</sup>. Dada la gran cantidad de conexiones aferentes y eferentes que esta región posee con otras cortezas y con estructuras subcorticales se lo puede considerar como un *hub* de interconexión<sup>204,251-254</sup>. Teniendo esto en cuenta, quisimos indagar sobre el rol de esta región en la reconsolidación de la memoria de evitación inhibitoria usada en nuestro laboratorio. Encontramos que hay un aumento de células c-Fos<sup>+</sup> producto de la reactivación en los animales entrenados con un shock fuerte, pero no para aquellos entrenados con un shock débil.

Un trabajo que utiliza *imaging* de alta resolución de las conexiones entre el hipocampo y RSC encontró que, a pesar de presentar conexiones con CA1, CA2, CA3 y DG,

existe una alta conectividad funcional con CA3 y DG, pero no con CA1 ni CA2<sup>255</sup>. Es interesante que, de manera similar a lo que vemos en RSC, observamos un aumento de la actividad en CA3 en los animales entrenados con un shock fuerte, pero no con un shock débil. Esto abre el interrogante sobre la posibilidad que la conectividad entre RSC y CA3 esté modulando el proceso de reactivación / reconsolidación de la memoria solamente cuando se utiliza un shock fuerte en el entrenamiento. Futuros experimentos usando quimiogenética y expresión de virus que nos permitan modular específicamente esta conexión nos permitirán esclarecer de manera más precisa el rol que tiene esta área en este proceso.

Por último, decidimos evaluar la participación de la corteza prefrontal (particularmente las cortezas IL, PrL y Cg de la corteza prefrontal medial). El descubrimiento de que el almacenamiento de las memorias más antiguas deja de depender principalmente del hipocampo, y que áreas corticales toman un lugar preponderante para esta función dio lugar al modelo clásico de formación de memoria, que postula que la formación y el almacenamiento inicial dependen del hipocampo, y que a través del proceso de consolidación sistémica la corteza prefrontal es reclutada para la recuperación de memorias remotas<sup>256–258</sup>. Más tarde, otros trabajos reportaron que la PFC es crucial también en etapas tempranas del aprendizaje<sup>256,259–261</sup>, y el descubrimiento de engramas en la PFC presentes desde el momento de la adquisición<sup>40,262</sup> llaman a reconsiderar el modelo clásico de formación de memoria y a investigar más profundamente el papel de esta región.

En este sentido, encontramos un aumento marcado de las células c-Fos<sup>+</sup> en la corteza IL y PrL de animales entrenados con un shock débil. Esto va en línea con trabajos previos que apuntan a una necesidad de la corteza prefrontal para la recuperación de memorias recientes<sup>260,263–265</sup>. Aún más sorprendente es el efecto encontrado en animales entrenados con un shock fuerte. Los ratones entrenados con este protocolo no muestran diferencias producto de la reactivación, pero cuando comparamos los grupos sIA-NR contra wIA-NR, encontramos un aumento significativo de las células c-Fos<sup>+</sup>. Algo que dificulta la interpretación de estos resultados, es que no incluimos un grupo entrenado y perfundido 90 minutos después del entrenamiento (es decir, un grupo que nos permita determinar de manera más certera la actividad en PFC después de los entrenamientos sIA o wIA) en nuestro protocolo. No podemos decir si estamos frente a un aumento de la actividad de la PFC producto del entrenamiento en animales entrenados con un shock fuerte que se mantiene por 48 horas, o si lo que vemos es una inhibición de la actividad en el grupo wIA-NR.

Al considerar estos resultados, hay que tener algunas limitaciones metodológicas en cuenta. Primero, para el análisis de las regiones, consideramos zonas relativamente restringidas de cada una, por lo que no podemos asegurar que estos resultados sean consistentes en toda la extensión de las distintas regiones estudiadas.

Además, c-Fos es un indicador indirecto de la actividad, distintos tipos celulares pueden presentar diferencias en los niveles de expresión de esta proteína, por lo que la relación entre aumento de células c-Fos<sup>+</sup> y actividad cerebral no necesariamente sea lineal en todo el cerebro. En este mismo sentido, estamos midiendo la actividad de un solo marcador. Se ha reportado que dentro de un mismo engrama se pueden identificar ensambles de neuronas funcionalmente heterogéneos. Por ejemplo, Sun *et al.*<sup>266</sup> encontraron que, en un protocolo de miedo contextual, el engrama identificado en el DG usando un reportero de c-Fos promueve la generalización de la memoria y recibe mayoritariamente *inputs* excitatorios, mientras que en la misma región, el engrama identificado usando un reportero de npas4 promueve la discriminación y recibe principalmente *inputs* inhibitorios. Es posible que, en áreas en donde no identificamos aumentos en la actividad producto de la reactivación, si lo hubiéramos hecho si utilizáramos otro reportero (por ejemplo, *creb*, *arc* o *zif268*).

Por último, solamente estudiamos un punto temporal, por lo que tampoco podemos descartar modificaciones de la actividad en las regiones observadas a otros tiempos luego de la reactivación.



## Consideraciones finales

## Rol de la dimerización de ERK2 en plasticidad y memoria.

Los resultados expuestos en el capítulo R1 de esta tesis sugieren que la dimerización de ERK2 es una modificación postraducciona esencial para la regulación de procesos de plasticidad y la reconsolidación de memorias de evitación inhibitoria en el ratón *Mus musculus*.

En este sentido, realizamos las primeras caracterizaciones de la presencia de dímeros de ERK2 cultivos primarios de tejido nervioso, y en el hipocampo de ratones CF-1, algo que no había sido reportado previamente. Asimismo, encontramos que la inhibición farmacológica de este proceso impide el mantenimiento del LTP en rodajas de hipocampo de ratón.

Teniendo resultados que sugieren un rol de la dimerización en procesos de plasticidad, decidimos evaluar qué sucede luego de la reactivación de la memoria de evitación inhibitoria. Encontramos que la dimerización es regulada diferencialmente según el tipo de entrenamiento utilizado. Es decir, aquellos animales que fueron entrenados con un shock de intensidad débil presentaron niveles de dimerización significativamente menores luego de la reactivación de la memoria que aquellos que no fueron reactivados. En cambio, para los animales que fueron entrenados con un shock fuerte no encontramos diferencias en la dimerización luego de la reactivación.

Al realizar estudios farmacológicos usando DEL-22379, un inhibidor selectivo de la dimerización, encontramos que la disminución de la dimerización luego de la reactivación en animales entrenados con un shock de intensidad fuerte conlleva a un deterioro en el desempeño de los animales en esta tarea. Sorprendentemente, encontramos que la administración de esta misma droga en animales entrenados con un shock de intensidad débil produce un aumento en su desempeño.

Se desconoce la farmacocinética de DEL y la cinética de dimerización luego de la reactivación, por lo que resultados adicionales son necesarios para esclarecer y explicar los resultados observados.

En conclusión, los resultados del Capítulo R1 de esta tesis aportan evidencia sobre la importancia de la regulación de la dimerización de ERK2 en procesos de plasticidad y memoria.

## Rol de MKP3 en memoria.

Otro mecanismo regulatorio de la actividad de ERK que decidimos estudiar para esta tesis fue la actividad de la fosfatasa MKP3. Esta fosfatasa es de expresión principalmente citosólica, por lo que sería una candidata para regular la actividad de la vía en este compartimento celular.

Encontramos que, de acuerdo con lo que esperábamos, luego de la reactivación de la memoria los niveles de esta fosfatasa siguen una dinámica de expresión inversa a la dinámica de fosforilación de ERK. Esta cinética diferencial depende del protocolo de entrenamiento usado.

Pusimos a punto la administración intra-hipocampal de BCI, un inhibidor de esta fosfatasa. Esto implica una valiosa herramienta farmacológica para el laboratorio, ya que nos permitirá diseñar experimentos en donde modulamos positivamente la actividad de ERK para estudiar el efecto en la conducta, algo con lo que no contábamos previamente.

En este sentido, sabiendo que hay un aumento de la señalización de ERK en animales entrenados con un shock débil pero no en los entrenados con un shock fuerte, nos preguntamos qué sucedería si inyectamos BCI en estos últimos. Interesantemente, encontramos que tiene un efecto detrimental en la conducta, haciendo que se comporten de manera similar a los entrenados con un shock fuerte.

Si bien experimentos adicionales serían necesarios para tener mayor certeza sobre los blancos afectados por BCI, los resultados del Capítulo R2 sugieren que la regulación de la actividad de ERK mediada por MKP3 constituye un mecanismo relevante para la reconsolidación de la memoria de evitación inhibitoria.

## Identificación de áreas cerebrales involucradas en la reconsolidación de la memoria de evitación inhibitoria.

Los últimos resultados presentados en esta tesis pretenden identificar estructuras involucradas en la reconsolidación de la tarea de evitación inhibitoria. Si bien ya se encuentra descartada la idea de que las memorias residen en un área cerebral única, se sabe que existe cierta distribución de la traza mnésica en regiones anatómicas específicas que pueden tomar mayor o menor relevancia según el tipo de tarea estudiada o la fase de la memoria observada. En esta última serie de experimentos nos propusimos indagar con mayor profundidad acerca de las áreas cerebrales involucradas en la tarea de evitación inhibitoria.

Encontramos que luego de la reactivación de la memoria hay un aumento de la expresión de c-Fos en distintas regiones del hipocampo. Tanto para animales entrenados con un shock de intensidad débil como fuerte, encontramos un aumento significativo de la actividad en CA1 del hipocampo, esto es consistente con la bibliografía, que señala a esta región del hipocampo como esencial para diversas tareas de aprendizaje y memoria, y con resultados previos de nuestro laboratorio, ya que la mayoría de las intervenciones farmacológicas realizadas apuntan a esta región, por lo que su involucramiento en la tarea era esperado. Además, encontramos que la región CA3 se activa luego de la reactivación de la memoria en animales que fueron entrenados con un shock fuerte, pero no de aquellos entrenados con un shock débil.

Para la amígdala lateral, otra región de gran importancia para memorias emocionales, encontramos una activación producto de la reactivación de la memoria para aquellos animales que fueron entrenados con un shock fuerte, pero no para los entrenados con el shock de intensidad débil.

En la corteza prefrontal encontramos diferencias en dos de sus regiones, la corteza infralímbica y la pre-límbica presentan mayores niveles de expresión luego de la reexposición para animales entrenados con un shock débil. Interesantemente, encontramos que los niveles de expresión de c-Fos de estas regiones parecen estar modulados positivamente por la intensidad del entrenamiento, ya que encontramos diferencias entre los grupos no reactivados.

Los resultados del capítulo R3 no solo amplían nuestra comprensión sobre el rol de distintas áreas cerebrales en el proceso de reconsolidación de la memoria de evitación inhibitoria, sino que también abren nuevas e intrigantes preguntas. Estos resultados constituyen un punto de partida clave para futuras investigaciones destinadas a desentrañar las bases neurobiológicas de la modulación de la memoria.

## Anexo a R1 - Información suplementaria

A)

Grupo	n	Media (DE)
ct+veh	4	1 (0)
ct+del	4	0.51 (0.23)
ltp+veh	4	1.50 (0.32)
ltp+del	4	0.64 (0.23)

B)

modelo: fosforilación ~ Droga * Tratamiento				Comparaciones post hoc	
Factores fijos	F <sub>(df1,df2)</sub>	p	η <sup>2</sup>	comparación	p
Droga	7.49 <sub>(1,12)</sub>	0.018	0.38	ct+veh vs ct+del	0.034
Tratamiento	33.55 <sub>(1,12)</sub>	8.56 x 10 <sup>-5</sup>	0.64	ltp+veh vs ltp+del	0.0006
D*T	2.55 <sub>(1,12)</sub>	0.138	0.17	ct+veh vs ltp+veh	0.029

Tabla R1S1 - Tabla estadística asociada a la [figura R1.2](#). (A) Estadística descriptiva (n, media y DE) de nivel de fosforilación (relativizada al grupo ct+veh). (B) Modelo GLM, estadística del ANOVA (F, p y η<sup>2</sup>) y comparaciones post-hoc realizadas (p valor ajustado por Tukey).

A)

Grupo	n	Media (DE)
veh (baseline)	4	1 (0.108)
del (baseline)	4	1 (0.121)
veh (post hfs)	4	1.31 (0.16)
del (post hfs)	4	1.12 (0.25)

B)

modelo: fEPSP ~ Droga * Tiempo + (1 raton)			
Factores fijos	F <sub>(df1,df2)</sub>	p	η <sup>2</sup>
Droga	5.49 <sub>(1,6)</sub>	0.019	0.24
Tiempo	2.96 <sub>(1,830)</sub>	0.085	0.05
D*T	41.13 <sub>(1,830)</sub>	1.44 x 10 <sup>-10</sup>	0.16

Tabla R1S2 - Tabla estadística asociada a la [figura R1.3](#). (A) Estadística descriptiva para el periodo de baseline y para el periodo post estimulación (hfs) para rodajas tratadas con vehículo o con del (relativizado al baseline). (B) Modelo GLMM y estadística del ANOVA de medidas repetidas realizado (F, p y η<sup>2</sup>).

A)

Grupo	n	Dimerización		Fosforilación	
		5 minutos	15 minutos	5 minutos	15 minutos
		Media (DE)			
veh+veh	4	1 (0.21)	1 (0.08)	1 (0.06)	1 (0.28)
egf+veh	8	1.09 (0.14)	1.30 (0.15)	1.95 (0.94)	0.588 (0.13)
egf+del	4	1.12 (0.21)	1.11 (0.11)	2.21 (0.88)	0.457 (0.12)

B)

modelo: var ~ grupo + (1 raton)						comparaciones post hoc	
Panel	var	Factor fijo	F <sub>(df1,df2)</sub>	p	η <sup>2</sup>	Comparación	p
Bi	pERK2	Grupo	5.38 <sub>(2,13)</sub>	0.048	0.41	veh+veh vs egf+veh	0.049
						veh+veh vs egf+del	0.051
						egf+del vs egf+veh	0.989
Bii	pERK2	Grupo	8.58 <sub>(2,13)</sub>	0.010	0.68	veh+veh vs egf+veh	0.010
						veh+veh vs egf+del	0.009
						egf+del vs egf+veh	0.555
Ci	dim ERK2	Grupo	0.27 <sub>(2,13)</sub>	0.769	0.06	-	-
Cii	dim ERK2	Grupo	11.62 <sub>(2,13)</sub>	0.004	0.75	veh+veh vs egf+veh	0.014
						veh+veh vs egf+del	0.915
						egf+del vs egf+veh	0.030

Tabla R1S3 - Tabla estadística asociada a la [figura R1.4](#). (A) Estadística descriptiva del nivel de dimerización o fosforilación (relativizada al grupo veh+veh). (B) Modelo GLMM, estadística del ANOVA, y comparaciones post-hoc realizadas (p valor ajustado por Tukey).

A)

Grupo	n	Media (DE)
wIA-RE	9	0.85 (0.14)
wIA-NR	7	1 (0.06)
sIA-RE	8	0.99 (0.12)
sIA-NR	7	1 (0.172)

B)

t test: dimerización ~ grupo		
grupo	t <sub>df</sub>	p
wIA re vs wIA nr	2.56 <sub>14</sub>	0.022
sIA re vs sIA nr	0.16 <sub>13</sub>	0.873

Tabla R1S4 - Tabla estadística asociada a la [figura R1.5](#). (A) Estadística descriptiva del nivel de dimerización (relativizada al grupo nr para cada tipo de entrenamiento). (B) Estadística del t-test realizado.

A)

Grupo	n	Media (DE)
nr+veh	8	1 (0.147)
re+veh	8	0.92 (0.18)
re+del	8	0.73 (0.15)

B)

modelo: dimerización ~ grupo				comparaciones post hoc		
Factor fijo	F <sub>(df1,df2)</sub>	p	η <sup>2</sup>	Comparación	t ratio	p
Grupo	5.55 <sub>(2,21)</sub>	0.011	0.35	nr+veh vs re+del	3.251	0.010
				re+veh vs re+del	2.267	0.056
				nr+veh vs re+veh	0.985	0.594

Tabla R1S5 - Tabla estadística asociada a la [figura R1.6](#). (A) Estadística descriptiva del nivel de dimerización (relativizada al grupo nr+veh). (B) Modelo GLM, estadística del ANOVA y comparaciones post-hoc realizadas (p valor ajustado por Tukey).



A)

Grupo	n	Mediana (IQR)			
		tr	re	ts	ts2
nr+veh	8	8(6-12)	-	300 (269-300)	300 (258-300)
nr+del	8	9.50 (7-13)	-	300 (243-300)	300 (199-300)
re+veh	8	8.50 (5-14)	300 (300-300)	300 (214-300)	300 (223-300)
re+del	8	7.50 (6-8)	300 (227 -300)	109 (72-208)	97 (62-136)

B)

modelo: latencia ~ reactivación * droga					comparaciones post hoc	
Panel	Factor fijo	F <sub>(df1,df2)</sub>	p	η <sup>2</sup>	Comparación	p
B (ts)	reactivación	9.71 <sub>(1,28)</sub>	0.004	0.26	nr+del vs nr+veh	0.983
	droga	4.10 <sub>(1,28)</sub>	0.052	0.13	nr+veh vs re+veh	0.684
	interacción	5.29 <sub>(2,28)</sub>	0.029	0.16	re+del vs re+veh	0.028
C (ts2)	conducta	9.72 <sub>(1,28)</sub>	0.004	0.26	nr+del vs nr+veh	0.965
	droga	12.81 <sub>(1,28)</sub>	0.001	0.31	nr+veh vs re+veh	0.842
	interacción	6.34 <sub>(2,28)</sub>	0.017	0.18	re+del vs re+veh	0.001

Tabla R1S6 - Tabla estadística asociada a la [figura R1.7](#). (A) Estadística descriptiva (n y mediana ± rango intercuartil) de la latencia de ingreso para cada una de las sesiones (tr, re, ts, ts2). (B) Modelo GLM, estadística del ANOVA (F, p y η<sup>2</sup>) y comparaciones post-hoc realizadas para la sesión de ts y ts2 (p valores ajustados por Tukey).

A)

figura R1.8B				
Grupo	n	Mediana (IQR)		
		tr	re	ts
nr+veh	8	16.5 (11-18)	-	201 (95-289)
nr+del	8	10.50 (6-15)	-	132 (74-202)
re+veh	9	10 (6-14)	153 (95-187)	105 (73-205)
re+del	9	11 (5-15)	125 (74-243)	291 (240-300)

B)

figura R1.8D		
Grupo	n	Media (DE)
nr+veh	8	1 (0.065)
re+veh	8	0.714 (0.139)
re+del	8	0.796 (0.112)

C)

modelo: latencia ~ reactivación * droga (panel B)					comparaciones post hoc	
modelo: dimerización ~ grupo (panel D)						
Panel	Factor fijo	F <sub>(df1,df2)</sub>	p	η <sup>2</sup>	Comparación	p
B (ts)	reactivación	3.93 <sub>(1,30)</sub>	0.056	0.22	nr+del vs nr+veh	0.378
	droga	5.45 <sub>(1,30)</sub>	0.026	0.15	nr+veh vs re+veh	0.273
	interacción	13.25 <sub>(2,30)</sub>	0.001	0.31	re+del vs re+veh	0.004
D	Grupo	13.25 <sub>(2,21)</sub>	0.0002	0.54	nr+veh vs re+del	0.0003
					re+veh vs re+del	0.375
					nr+veh vs re+veh	0.006

Tabla R1S7 - Tabla estadística asociada a la [figura R1.8](#). (A) y (B) Estadística descriptiva asociada a las figuras R1.8B y R1.8D respectivamente. (C) Modelo GLM, estadística del ANOVA (F, p y η<sup>2</sup>) y comparaciones post-hoc realizadas para la sesión de ts y ts2 (p valores ajustados por Tukey).

## Anexo a R2 - Información suplementaria

A)

Grupo	n	15 minutos	n	45 minutos
		Media (DE)		Media (DE)
sIA-NR	10	1.00 (0.11)	8	1.00 (0.17)
sIA-RE	10	0.77 (0.12)	9	1.46 (0.15)
wIA-NR	11	1.00 (0.19)	11	1.00 (0.15)
wIA-RE	11	0.61 (0.14)	9	0.76 (0.11)

B)

modelo: mkp3 ~ entrenamiento * reactivación					Comparaciones post hoc	
Panel	Factor fijo	F <sub>(df1,df2)</sub>	p	η <sup>2</sup>	comparación	p
B	entrenamiento	0.82 <sub>(1,28)</sub>	0.361	0.12	sIA-NR vs sIA-RE	0.012
	reactivación	10.26 <sub>(1,28)</sub>	0.002	0.36	wIA-NR vs wIA-RE	0.017
	interacción	4.32 <sub>(1,28)</sub>	0.036	0.51		
C	entrenamiento	48.6 <sub>(1,33)</sub>	5.72 x 10 <sup>-8</sup>	0.60	sIA-NR vs sIA-RE	<0.001
	reactivación	0.25 <sub>(1,33)</sub>	0.251	0.04	wIA-NR vs wIA-RE	0.006
	interacción	49.02 <sub>(1,33)</sub>	5.22 x 10 <sup>-8</sup>	0.32		

Tabla R2S1 - Tabla estadística asociada a la [figura R2.2](#). (A) Estadística descriptiva (n, media y de) de nivel de expresión de MKP3 (relativizada al grupo NR). (B) Modelo GLM usado, estadística del ANOVA (F, p y η<sup>2</sup>) y comparaciones post-hoc realizadas (p valor ajustado por Tukey).

A)

Grupo	n	5 minutos		15 minutos	
		Media (DE)	n	Media (DE)	
veh	12	1 (0.11)	15	1 (0.11)	
BCI 0.3 $\mu$ M	4	1.14 (0.23)	5	1.17 (0.17)	
BCI 3 $\mu$ M	4	1.08 (0.17)	5	1.04 (0.07)	
BCI 30 $\mu$ M	4	1.10 (0.12)	5	1.11 (0.13)	

B)

modelo: mkp3 ~ grupo + (1 raton)				
Panel	Factor fijo	$F_{(df1,df2)}$	p	$\eta^2$
B (5 minutos)	Grupo	1.44 <sub>(3,20)</sub>	0.271	0.23
C (15 minutos)	Grupo	2.72 <sub>(3,26)</sub>	0.070	0.28

Tabla R2S2 - Tabla estadística asociada a la [figura R2.3](#). (A) Estadística descriptiva (n, media y DE) del nivel de expresión de MKP3 (relativizada al grupo veh) 5 y 15 minutos después de la administración de BCI. (B) Modelo GLMM y estadística del ANOVA (F, p y  $\eta^2$ ).

A)

5 minutos				15 minutos			
Grupo	n	Media (SD)		Grupo	n	Media (SD)	
		pERK1	pERK2			pERK1	pERK2
veh	12	1 (0.24)	1 (0.13)	veh	15	1 (0.30)	1 (0.22)
bci 0.3	4	1.17 (0.38)	0.961 (0.24)	bci 0.3	5	1.35 (0.38)	1.28 (0.21)
bci 3	4	1.11 (0.29)	1.37 (0.31)	bci 3	5	1.47 (0.18)	1.80 (0.45)
bci 30	4	1.03 (0.44)	0.899 (0.25)	bci 30	5	1.04 (0.34)	0.993 (0.18)

B)

modelo: pERK ~ Grupo + (1 raton)						comparaciones post hoc	
Tiempo	ERK	Factor fijo	$F_{(df1,df2)}$	p	$\eta^2$	comparación veh vs:	p
5 min	pERK1	Grupo	0.32 <sub>(3,20)</sub>	0.806	0.06	-	-
						bci 0.3	0.983
	pERK2	Grupo	3.73 <sub>(3,20)</sub>	0.034	0.43	bci 3	0.022
						bci 30	0.794
15 min						bci 0.3	0.134
	pERK1	Grupo	3.66 <sub>(3,26)</sub>	0.028	0.34	bci 3	0.027
						bci 30	0.994
						bci 0.3	0.194
	pERK2	Grupo	10.94 <sub>(3,26)</sub>	0.0001	0.61	bci 3	0.0001
						bci 30	0.999

Tabla R2S3 - Tabla estadística asociada a la [figura R2.4](#). (A) Estadística descriptiva (n, media y DE) del nivel de fosforilación de ERK1 y ERK2 (relativizada al grupo veh) 5 y 15 minutos después de la administración de BCI. (B) Modelo GLMM, estadística del ANOVA (F, p y  $\eta^2$ ) y comparaciones post-hoc realizadas (p valor ajustado por Tukey).

A)

Grupo	n	Mediana (IQR)		
		tr	re	ts
nr+veh	6	9 (7-12)	-	300 (266-300)
nr+bci	6	11 (9-12)	-	300 (286-300)
re+veh	6	6 (5-15)	300 (280-300)	300 (300-300)
re+bci	6	12 (8-15)	300 (300-300)	163 (141-300)

B)

modelo: latencia ~ reactivación * droga					comparaciones post hoc	
Panel	Factor fijo	F <sub>(df1,df2)</sub>	p	η <sup>2</sup>	Comparación	p
B (ts)	reactivación	2.77 <sub>(1,20)</sub>	0.111	0.12	nr+bci vs nr+veh	0.974
	droga	4.84 <sub>(1,20)</sub>	0.039	0.20	nr+veh vs re+veh	0.856
	interacción	9.46 <sub>(2,20)</sub>	0.005	0.32	re+bci vs re+veh	0.005

Tabla R2S4 - Tabla estadística asociada a la [figura R2.4](#). (A) Estadística descriptiva (n y mediana ± rango intercuartil) de la latencia de ingreso para cada una de las sesiones (tr, re, ts). (B) Modelo GLM, estadística del ANOVA (F, p y η<sup>2</sup>) y comparaciones post-hoc realizadas para la sesión de ts (p valores ajustados por Tukey).

## Anexo a R3 - Información suplementaria



A)

Grupo	CA1		CA2		CA3		DG	
	n	Media (DE)	n	Media (DE)	n	Media (DE)	n	Media (DE)
sIA-NR	3 (16)	12.97 (8.96)	3 (16)	10.99 (6.01)	3 (16)	13.77 (7.22)	3 (16)	7.68 (3.44)
sIA-RE	3 (16)	40.4 (9.33)	3 (16)	18.26 (16.42)	3 (15)	27.97 (12.36)	3 (15)	7.66 (2.31)
wIA-NR	3 (14)	4.75 (1.71)	3 (15)	6.6 (4.42)	3 (16)	12.57 (3.42)	3 (16)	9.06 (2.83)
wIA-RE	3 (14)	23.7 (7.77)	3 (14)	15.3 (5.74)	3 (14)	18.33 (6.76)	3 (14)	9.43 (3.23)

B)

cFos ~ entrenamiento * reactivación + (1 ratón)					Comparaciones post hoc	
región	Factores fijos	F	p	$\eta^2$	comparación	p
CA1	Entrenamiento	7.94	0.004	0.66	sIA-NR vs sIA-RE wIA-NR vs wIA-RE sIA-RE vs wIA-RE	0.001 0.009 0.023
	Reactivación	3.42	0.215	0.88		
	E*R	12.55	$6.82 \times 10^{-5}$	0.22		
CA2	Entrenamiento	7.94	0.491	0.06	-	-
	Reactivación	3.42	0.157	0.12		
	E*R	2.55	0.786	0.01		
CA3	Entrenamiento	7.17	0.06	0.37	sIA-NR vs sIA-RE wIA-NR vs wIA-RE sIA-RE vs wIA-RE	0.016 0.468 0.097
	Reactivación	3.99	0.127	0.38		
	E*R	8.92	0.004	0.27		
DG	Entrenamiento	2.14	0.752	0.16		
	Reactivación	3.33	0.364	0.08		
	E*R	5.17	0.911	0.11		

Tabla R3S1 - Tabla estadística asociada a la [figura R3.2](#). (A) Estadística descriptiva (cantidad de animales y entre paréntesis se consigna la cantidad de imágenes totales, media y DE) de la densidad de células cFos<sup>+</sup> para cada grupo y región. (B) Modelo GLMM, estadística del ANOVA (F, p y  $\eta^2$ ) y comparaciones post-hoc realizadas (p valor ajustado por Tukey).

A)

Grupo	n	Media (DE)
sIA-NR	3 (12)	6.30 (4.2)
sIA-RE	3 (13)	17.02 (5.6)
wIA-NR	3 (16)	7.87 (5.68)
wIA-RE	3 (16)	6.11 (2.8)

B)

cfos ~ entrenamiento * reactivación + (1 ratón)						Comparaciones post hoc
región	Factores fijos	F	p	$\eta^2$	comparación	p
LA	Entrenamiento	3.49	0.133	0.21		
					sIA-NR vs sIA-RE	0.013
	Reactivación	7.98	0.090	0.40	wIA-NR vs wIA-RE	0.722
					sIA-RE vs wIA-RE	0.018
	E*R	9.33	0.033	0.62		

Tabla R3S2 - Tabla estadística asociada a la [figura R3.3](#). (A) Estadística descriptiva (cantidad de animales y entre paréntesis se consigna la cantidad de imágenes totales, media y DE) de la densidad de células cFos<sup>+</sup> para cada grupo en la amígdala lateral (LA). (B) Modelo GLMM, estadística del ANOVA (F, p y  $\eta^2$ ) y comparaciones post-hoc realizadas (p valor ajustado por Tukey).

A)

Grupo	Cg		PrL		IL	
	n	Media (DE)	n	Media (DE)	n	Media (DE)
sIA-NR	3 (12)	35.08 (9.66)	3 (10)	21.08 (10.09)	3 (8)	34.42 (6.25)
sIA-RE	3 (15)	32.68 (11.53)	3 (14)	24.46 (12.15)	3 (15)	36.07 (10.39)
wIA-NR	3 (14)	22.56 (6.73)	3 (14)	4.92 (2.59)	3 (15)	5.72 (5.72)
wIA-RE	3 (11)	34.75 (11.48)	3 (10)	29.58 (11.03)	3 (13)	15.66 (15.66)

B)

cfos ~ entrenamiento * reactivación + (1 ratón)					Comparaciones post hoc	
región	Factores fijos	F	p	$\eta^2$	comparación	p
Cg	Entrenamiento	7.22	0.234	0.12	-	-
	Reactivación	7.47	0.253	0.11		
	E*R	7.60	0.107	0.20		
PrL	Entrenamiento	0.38	0.550	0.05	sIA-NR vs sIA-RE wIA-NR vs wIA-RE sIA-RE vs wIA-RE	0.985 0.002 0.042
	Reactivación	14.25	0.005	0.64		
	E*R	9.45	0.142	0.53		
IL	Entrenamiento	2.05	0.190	0.21	sIA-NR vs sIA-RE wIA-NR vs wIA-RE sIA-RE vs wIA-RE	0.756 0.013 0.009
	Reactivación	8.88	0.017	0.53		
	E*R	6.72	0.032	0.46		

Tabla R3S3 - Tabla estadística asociada a la [figura R3.4](#). (A) Estadística descriptiva (cantidad de animales y entre paréntesis se consigna la cantidad de imágenes totales, media y DE) de la densidad de células cFos<sup>+</sup> para cada grupo y región. (B) Modelo GLMM, estadística del ANOVA (F, p y  $\eta^2$ ) y comparaciones post-hoc realizadas (p valor ajustado por Tukey).

A)

Grupo	n	Media (DE)
sIA-NR	3 (16)	46.3 (10.62)
sIA-RE	3 (16)	66.66 (12.97)
wIA-NR	3 (16)	39.77 (9.29)
wIA-RE	3 (14)	50.22 (5.22)

B)

cfos ~ entrenamiento * reactivación + (1 ratón)						Comparaciones post hoc
región	Factores fijos	F	p	$\eta^2$	comparación	p
RSC	Entrenamiento	9.17	0.016	0.54		
					sIA-NR vs sIA-RE	0.004
	Reactivación	1.74	0.223	0.18	wIA-NR vs wIA-RE	0.064
					sIA-RE vs wIA-RE	0.015
	E*R	19.24	0.002	0.71		

Tabla R3S4 - Tabla estadística asociada a la [figura R3.3](#). (A) Estadística descriptiva (cantidad de animales y entre paréntesis se consigna la cantidad de imágenes totales, media y DE) de la densidad de células cFos<sup>+</sup> para cada grupo en la corteza retrosplenial (RSC). (B) Modelo GLMM, estadística del ANOVA (F, p y  $\eta^2$ ) y comparaciones post-hoc realizadas (p valor ajustado por Tukey).

## Bibliografía

1. Oswald, I. Learning and Instinct in Animals. By W. H. Thorpe, London: Methuen and Co. Ltd. 1963. Pp. 558. Price 63s. *Br. J. Psychiatry* **110**, 141–142 (1964).
2. Dudai, Y. *Memory from A to Z: Keywords, Concepts, and Beyond*. (Oxford University Press, Oxford, New York, 2004).
3. Skinner, B. F. The rate of establishment of a discrimination. *J. Gen. Psychol.* **9**, 302–350 (1933).
4. Skinner, B. F. Two Types of Conditioned Reflex and a Pseudo Type. *J. Gen. Psychol.* **12**, 66–77 (1935).
5. Altered activity of the medial prefrontal cortex and amygdala during acquisition and extinction of an active avoidance task - PubMed.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26441578/>.
6. Bravo-Rivera, C., Roman-Ortiz, C., Brignoni-Perez, E., Sotres-Bayon, F. & Quirk, G. J. Neural structures mediating expression and extinction of platform-mediated avoidance. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **34**, 9736–9742 (2014).
7. Safety signals as instrumental reinforcers during free-operant avoidance - PubMed.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25135197/>.
8. S, K., Tw, R. & Bj, E. Different types of fear-conditioned behaviour mediated by separate nuclei within amygdala. *Nature* **388**, (1997).
9. Oleson, E. B., Gentry, R. N., Chioma, V. C. & Cheer, J. F. Subsecond dopamine release in the nucleus accumbens predicts conditioned punishment and its successful avoidance. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **32**, 14804–14808 (2012).
10. Mowrer, O. H. Two-factor learning theory: summary and comment. *Psychol. Rev.* **58**, 350–354 (1951).
11. Mowrer, O. On the dual nature of learning—a re-interpretation of ‘conditioning’ and ‘problem-solving.’ *Harv. Educ. Rev.* (1947).

12. Mowrer, O. H. *Learning Theory and Behavior*. xii, 555 (John Wiley & Sons Inc, Hoboken, NJ, US, 1960). doi:10.1037/10802-000.
13. Masterson, F. A. & Crawford, M. The defense motivation system: A theory of avoidance behavior. *Behav. Brain Sci.* **5**, 661–675 (1982).
14. McAllister, D. E. & McAllister, W. R. Fear theory and aversively motivated behavior: Some controversial issues. in *Fear, avoidance, and phobias: A fundamental analysis* 135–163 (Lawrence Erlbaum Associates, Inc, Hillsdale, NJ, US, 1991).
15. Overmier, J. B. & Brackbill, R. M. On the independence of stimulus evocation of fear and fear evocation of responses. *Behav. Res. Ther.* **15**, 51–56 (1977).
16. Miller, N. E. & Murray, E. J. Displacement and conflict; learnable drive as a basis for the steeper gradient of avoidance than of approach. *J. Exp. Psychol.* **43**, 227–231 (1952).
17. Rescorla, R. A. & Solomon, R. L. Two-process learning theory: Relationships between Pavlovian conditioning and instrumental learning. *Psychol. Rev.* **74**, 151–182 (1967).
18. Squire, L. R., Genzel, L., Wixted, J. T. & Morris, R. G. Memory Consolidation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, a021766 (2015).
19. McGaugh, J. L. Time-Dependent Processes in Memory Storage. *Science* **153**, 1351–1358 (1966).
20. Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtniss / von G.E. Müller und A. Pilzecker. *Wellcome Collection* <https://wellcomecollection.org/works/d68pp8k8/items>.
21. Memory--a Century of Consolidation | Science. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.287.5451.248>.
22. Dudai, Y. & Morris, R. G. M. To consolidate or not to consolidate: what are the questions? in *Brain, Perception, Memory: Advances in Cognitive Neuroscience* (ed. Bolhuis, J. J.) 0 (Oxford University Press, 2000). doi:10.1093/acprof:oso/9780198524823.003.0011.

23. Flexner, J. B., Flexner, L. B. & Stellar, E. Memory in Mice as Affected by Intracerebral Puromycin. *Science* **141**, 57–59 (1963).
24. Dudai, Y. The Neurobiology of Consolidations, Or, How Stable is the Engram? *Annu. Rev. Psychol.* **55**, 51–86 (2004).
25. Vianna, M. R., Szapiro, G., McGaugh, J. L., Medina, J. H. & Izquierdo, I. Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 12251–12254 (2001).
26. Bailey, D. J., Kim, J. J., Sun, W., Thompson, R. F. & Helmstetter, F. J. Acquisition of fear conditioning in rats requires the synthesis of mRNA in the amygdala. *Behav. Neurosci.* **113**, 276–282 (1999).
27. Kida, S. & Serita, T. Functional roles of CREB as a positive regulator in the formation and enhancement of memory. *Brain Res. Bull.* **105**, 17–24 (2014).
28. Silva, A. J., Kogan, J. H., Frankland, P. W. & Kida, S. CREB and memory. *Annu. Rev. Neurosci.* **21**, 127–148 (1998).
29. Bernabeu, R. *et al.* Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 7041–7046 (1997).
30. Bourtchouladze, R. *et al.* Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* **5**, 365–374 (1998).
31. Marra, V., O'Shea, M., Benjamin, P. R. & Kemenes, I. Susceptibility of memory consolidation during lapses in recall. *Nat. Commun.* **4**, 1578 (2013).
32. Freudenthal, R. *et al.* NF-kappaB transcription factor is required for inhibitory avoidance long-term memory in mice. *Eur. J. Neurosci.* **21**, 2845–2852 (2005).



33. Freudenthal, R. & Romano, A. Participation of Rel/NF-kappaB transcription factors in long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Brain Res.* **855**, 274–281 (2000).
34. Besnard, A., Laroche, S. & Caboche, J. Comparative dynamics of MAPK/ERK signalling components and immediate early genes in the hippocampus and amygdala following contextual fear conditioning and retrieval. *Brain Struct. Funct.* **219**, 415–430 (2014).
35. Martin, K. C. *et al.* MAP kinase translocates into the nucleus of the presynaptic cell and is required for long-term facilitation in *Aplysia*. *Neuron* **18**, 899–912 (1997).
36. Berman, D. E., Hazvi, S., Rosenblum, K., Seger, R. & Dudai, Y. Specific and Differential Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades by Unfamiliar Taste in the Insular Cortex of the Behaving Rat. *J. Neurosci.* **18**, 10037–10044 (1998).
37. Blum, S., Moore, A. N., Adams, F. & Dash, P. K. A mitogen-activated protein kinase cascade in the CA1/CA2 subfield of the dorsal hippocampus is essential for long-term spatial memory. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **19**, 3535–3544 (1999).
38. Salmon, D. P., Lasker, B. R., Butters, N. & Beatty, W. W. Remote memory in a patient with circumscribed amnesia. *Brain Cogn.* **7**, 201–211 (1988).
39. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions - PubMed.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13406589/>.
40. Kitamura, T. *et al.* Engrams and circuits crucial for systems consolidation of a memory. *Science* **356**, 73–78 (2017).
41. Roy, D. S. *et al.* Brain-wide mapping reveals that engrams for a single memory are distributed across multiple brain regions. *Nat. Commun.* **13**, 1799 (2022).
42. Tonegawa, S., Morrissey, M. D. & Kitamura, T. The role of engram cells in the systems consolidation of memory. *Nat. Rev. Neurosci.* **19**, 485–498 (2018).

43. Choi, J.-H. *et al.* Interregional synaptic maps among engram cells underlie memory formation. *Science* **360**, 430–435 (2018).
44. DeNardo, L. A. *et al.* Temporal evolution of cortical ensembles promoting remote memory retrieval. *Nat. Neurosci.* **22**, 460–469 (2019).
45. Reconsolidation: maintaining memory relevance - PubMed.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19640595/>.
46. Pedreira, M. E., Pérez-Cuesta, L. M. & Maldonado, H. Mismatch between what is expected and what actually occurs triggers memory reconsolidation or extinction. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* **11**, 579–585 (2004).
47. Robinson, M. J. F., Ross, E. C. & Franklin, K. B. J. The effect of propranolol dose and novelty of the reactivation procedure on the reconsolidation of a morphine place preference. *Behav. Brain Res.* **216**, 281–284 (2011).
48. Forcato, C., Argibay, P. F., Pedreira, M. E. & Maldonado, H. Human reconsolidation does not always occur when a memory is retrieved: The relevance of the reminder structure. *Neurobiol. Learn. Mem.* **91**, 50–57 (2009).
49. Sinclair, A. H. & Barense, M. D. Prediction Error and Memory Reactivation: How Incomplete Reminders Drive Reconsolidation. *Trends Neurosci.* **42**, 727–739 (2019).
50. Fernández, R. S., Boccia, M. M. & Pedreira, M. E. The fate of memory: Reconsolidation and the case of Prediction Error. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **68**, 423–441 (2016).
51. Krawczyk, M. C., Fernández, R. S., Pedreira, M. E. & Boccia, M. M. Toward a better understanding on the role of prediction error on memory processes: From bench to clinic. *Neurobiol. Learn. Mem.* **142**, 13–20 (2017).
52. Dudai, Y. Reconsolidation: the advantage of being refocused. *Curr. Opin. Neurobiol.* **16**, 174–178 (2006).

53. Nader, K., Schafe, G. E. & LeDoux, J. E. The labile nature of consolidation theory. *Nat. Rev. Neurosci.* **1**, 216–219 (2000).
54. Haubrich, J. & Nader, K. Memory Reconsolidation. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* **37**, 151–176 (2018).
55. Rose, J. K. & Rankin, C. H. Blocking Memory Reconsolidation Reverses Memory-Associated Changes in Glutamate Receptor Expression. *J. Neurosci.* **26**, 11582–11587 (2006).
56. Schiller, D. *et al.* Preventing the return of fear in humans using reconsolidation update mechanisms. *Nature* **463**, 49–53 (2010).
57. Hubbach, A., Gomez, R., Hardt, O. & Nadel, L. Reconsolidation of episodic memories: A subtle reminder triggers integration of new information. *Learn. Mem.* **14**, 47–53 (2007).
58. Walker, M. P., Brakefield, T., Hobson, J. A. & Stickgold, R. Dissociable stages of human memory consolidation and reconsolidation. *Nature* **425**, 616–620 (2003).
59. Elsey, J. W. B., Van Ast, V. A. & Kindt, M. Human memory reconsolidation: A guiding framework and critical review of the evidence. *Psychol. Bull.* **144**, 797–848 (2018).
60. Suzuki, A. *et al.* Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **24**, 4787–4795 (2004).
61. Strekalova, T. *et al.* Memory retrieval after contextual fear conditioning induces c-Fos and JunB expression in CA1 hippocampus. *Genes Brain Behav.* **2**, 3–10 (2003).
62. Bozon, B., Davis, S. & Laroche, S. A requirement for the immediate early gene zif268 in reconsolidation of recognition memory after retrieval. *Neuron* **40**, 695–701 (2003).
63. von Herten, L. S. J. & Giese, K. P. Memory reconsolidation engages only a subset of immediate-early genes induced during consolidation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **25**, 1935–1942 (2005).

64. Doyère, V., Debiec, J., Monfils, M.-H., Schafe, G. E. & LeDoux, J. E. Synapse-specific reconsolidation of distinct fear memories in the lateral amygdala. *Nat. Neurosci.* **10**, 414–416 (2007).
65. Miller, C. A. & Marshall, J. F. Molecular substrates for retrieval and reconsolidation of cocaine-associated contextual memory. *Neuron* **47**, 873–884 (2005).
66. Josselyn, S. A. & Tonegawa, S. Memory engrams: Recalling the past and imagining the future. *Science* **367**, eaaw4325 (2020).
67. Josselyn, S. A., Köhler, S. & Frankland, P. W. Finding the engram. *Nat. Rev. Neurosci.* **16**, 521–534 (2015).
68. Shpokayte, M. *et al.* Hippocampal cells segregate positive and negative engrams. *Commun. Biol.* **5**, 1–15 (2022).
69. Liu, X. *et al.* Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. *Nature* **484**, 381–385 (2012).
70. Ramirez, S. *et al.* Creating a False Memory in the Hippocampus. *Science* **341**, 387–391 (2013).
71. Lacagnina, A. F. *et al.* Distinct hippocampal engrams control extinction and relapse of fear memory. *Nat. Neurosci.* **22**, 753–761 (2019).
72. Dorst, K. E. *et al.* Hippocampal Engrams Generate Variable Behavioral Responses and Brain-Wide Network States. *J. Neurosci.* **44**, e0340232023 (2024).
73. Zhang, X., Kim, J. & Tonegawa, S. Amygdala Reward Neurons Form and Store Fear Extinction Memory. *Neuron* **105**, 1077–1093.e7 (2020).
74. Ryan, T. J., Roy, D. S., Pignatelli, M., Arons, A. & Tonegawa, S. Engram cells retain memory under retrograde amnesia. *Science* **348**, 1007–1013 (2015).

75. Hammack, R. J., Fischer, V. E., Andrade, M. A. & Toney, G. M. Anterior basolateral amygdala neurons comprise a remote fear memory engram. *Front. Neural Circuits* **17**, (2023).
76. Zaki, Y. *et al.* Hippocampus and amygdala fear memory engrams re-emerge after contextual fear relapse. *Neuropsychopharmacology* **47**, 1992–2001 (2022).
77. Stegemann, A. *et al.* Prefrontal engrams of long-term fear memory perpetuate pain perception. *Nat. Neurosci.* **26**, 820–829 (2023).
78. Gu, X. *et al.* Dynamic tripartite construct of interregional engram circuits underlies forgetting of extinction memory. *Mol. Psychiatry* **27**, 4077–4091 (2022).
79. Lee, J.-H., Kim, W. B., Park, E. H. & Cho, J.-H. Neocortical synaptic engrams for remote contextual memories. *Nat. Neurosci.* **26**, 259–273 (2023).
80. Nambu, M. F., Lin, Y.-J., Reuschenbach, J. & Tanaka, K. Z. What does engram encode?: Heterogeneous memory engrams for different aspects of experience. *Curr. Opin. Neurobiol.* **75**, 102568 (2022).
81. Zelikowsky, M., Hersman, S., Chawla, M. K., Barnes, C. A. & Fanselow, M. S. Neuronal Ensembles in Amygdala, Hippocampus, and Prefrontal Cortex Track Differential Components of Contextual Fear. *J. Neurosci.* **34**, 8462–8466 (2014).
82. Opitz, B. Memory Function and the Hippocampus. (2014) doi:10.1159/000356422.
83. Lisman, J. *et al.* Viewpoints: how the hippocampus contributes to memory, navigation and cognition. *Nat. Neurosci.* **20**, 1434–1447 (2017).
84. Bird, C. M. & Burgess, N. The hippocampus and memory: insights from spatial processing. *Nat. Rev. Neurosci.* **9**, 182–194 (2008).
85. Voss, J. L., Bridge, D. J., Cohen, N. J. & Walker, J. A. A Closer Look at the Hippocampus and Memory. *Trends Cogn. Sci.* **21**, 577–588 (2017).

86. Franz, S. I. & Lashley, K. S. The retention of habits by the rat after destruction of the frontal portion of the cerebrum. *Psychobiology* **1**, 3–18 (1917).
87. Lashley, K. S. In search of the engram. in *Physiological mechanisms in animal behavior. (Society's Symposium IV.)* 454–482 (Academic Press, Oxford, England, 1950).
88. Gallo, F. T., Katche, C., Morici, J. F., Medina, J. H. & Weisstaub, N. V. Immediate Early Genes, Memory and Psychiatric Disorders: Focus on c-Fos, Egr1 and Arc. *Front. Behav. Neurosci.* **12**, (2018).
89. Minatohara, K., Akiyoshi, M. & Okuno, H. Role of Immediate-Early Genes in Synaptic Plasticity and Neuronal Ensembles Underlying the Memory Trace. *Front. Mol. Neurosci.* **8**, (2016).
90. Han, J.-H. *et al.* Selective erasure of a fear memory. *Science* **323**, 1492–1496 (2009).
91. Mechanisms of Memory - 2nd Edition | Elsevier Shop.  
<https://shop.elsevier.com/books/mechanisms-of-memory/sweatt/978-0-12-374951-2>.
92. Hebb, D. O. *The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory*. (Psychology Press, New York, 2002). doi:10.4324/9781410612403.
93. Bliss, T. V. & Lomo, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* **232**, 331–356 (1973).
94. Lomo: Frequency potentiation of excitatory synaptic... - Google Scholar.  
[https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=Frequency+potentiation+of+excitatory+synaptic+activity+in+dentate+area+of+hippocampal+formation%2E&journal=Acta+Physiol%2E+Scand%2E&author=L%C3%B8mo+T.&publication\\_year=1966&volume=68&issue=128](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Frequency+potentiation+of+excitatory+synaptic+activity+in+dentate+area+of+hippocampal+formation%2E&journal=Acta+Physiol%2E+Scand%2E&author=L%C3%B8mo+T.&publication_year=1966&volume=68&issue=128).

95. Dringenberg, H. C. The history of long-term potentiation as a memory mechanism: Controversies, confirmation, and some lessons to remember. *Hippocampus* **30**, 987–1012 (2020).
96. Lynch, M. A. Long-term potentiation and memory. *Physiol. Rev.* **84**, 87–136 (2004).
97. Stevens, C. F. A Million Dollar Question: Does LTP=Memory? *Neuron* **20**, 1–2 (1998).
98. Malenka, R. C. Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD. *Cell* **78**, 535–538 (1994).
99. Ojea Ramos, S., Feld, M. & Fustiñana, M. S. Contributions of extracellular-signal regulated kinase 1/2 activity to the memory trace. *Front. Mol. Neurosci.* **15**, (2022).
100. Davis, R. J. Transcriptional regulation by MAP kinases. *Mol. Reprod. Dev.* **42**, 459–467 (1995).
101. Thomas, G. M. & Huganir, R. L. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 173–183 (2004).
102. Yoon, S. & Seger, R. The extracellular signal-regulated kinase: Multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* **24**, 21–44 (2006).
103. Casar, B. & Crespo, P. ERK Signals: Scaffolding Scaffolds? *Front. Cell Dev. Biol.* **4**, (2016).
104. Miningou, N. & Blackwell, K. T. The road to ERK activation: Do neurons take alternate routes? *Cell. Signal.* **68**, 109541 (2020).
105. Simard, F. A., Cloutier, A., Ear, T., Vardhan, H. & McDonald, P. P. MEK-independent ERK activation in human neutrophils and its impact on functional responses. *J. Leukoc. Biol.* **98**, 565–573 (2015).
106. Aksamitiene, E., Kholodenko, B. N., Kolch, W., Hoek, J. B. & Kiyatkin, A. PI3K/Akt-sensitive MEK-independent compensatory circuit of ERK activation in ER-positive PI3K-mutant T47D breast cancer cells. *Cell. Signal.* **22**, 1369–1378 (2010).

107. Caunt, C. J. & Keyse, S. M. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs). *FEBS J.* **280**, 489–504 (2013).
108. Ünal, E. B., Uhlitz, F. & Blüthgen, N. A compendium of ERK targets. *FEBS Lett.* **591**, 2607–2615 (2017).
109. Yang, L., Zheng, L., Chng, W. J. & Ding, J. L. Comprehensive Analysis of ERK1/2 Substrates for Potential Combination Immunotherapies. *Trends Pharmacol. Sci.* **40**, 897–910 (2019).
110. Cargnello, M. & Roux, P. P. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **75**, 50–83 (2011).
111. Chen, R. H., Sarnecki, C. & Blenis, J. Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 915–927 (1992).
112. Lenormand, P. *et al.* Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *J. Cell Biol.* **122**, 1079–1088 (1993).
113. Khokhlatchev, A. V. *et al.* Phosphorylation of the MAP Kinase ERK2 Promotes Its Homodimerization and Nuclear Translocation. *Cell* **93**, 605–615 (1998).
114. Adachi, M., Fukuda, M. & Nishida, E. Two co-existing mechanisms for nuclear import of MAP kinase: passive diffusion of a monomer and active transport of a dimer. *EMBO J.* **18**, 5347–5358 (1999).
115. Burack, W. R. & Shaw, A. S. Live Cell Imaging of ERK and MEK: SIMPLE BINDING EQUILIBRIUM EXPLAINS THE REGULATED NUCLEOCYTOPLASMIC DISTRIBUTION OF ERK\*. *J. Biol. Chem.* **280**, 3832–3837 (2005).



116. Casar, B., Pinto, A. & Crespo, P. Essential Role of ERK Dimers in the Activation of Cytoplasmic but Not Nuclear Substrates by ERK-Scaffold Complexes. *Mol. Cell* **31**, 708–721 (2008).
117. Guo, Y.-J. *et al.* ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). *Exp. Ther. Med.* **19**, 1997–2007 (2020).
118. Sun, Y. *et al.* Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *J. Recept. Signal Transduct.* **35**, 600–604 (2015).
119. Lavoie, H., Gagnon, J. & Therrien, M. ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21**, 607–632 (2020).
120. Philipova, R. & Whitaker, M. Active ERK1 is dimerized in vivo: bisphosphodimers generate peak kinase activity and monophosphodimers maintain basal ERK1 activity. *J. Cell Sci.* **118**, 5767–5776 (2005).
121. Herrero, A. *et al.* Small Molecule Inhibition of ERK Dimerization Prevents Tumorigenesis by RAS-ERK Pathway Oncogenes. *Cancer Cell* **28**, 170–182 (2015).
122. Bermudez, O. *et al.* Post-transcriptional regulation of the DUSP6/MKP-3 phosphatase by MEK/ERK signaling and hypoxia. *J. Cell. Physiol.* **226**, 276–284 (2011).
123. Jeffrey, K. L., Camps, M., Rommel, C. & Mackay, C. R. Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 391–403 (2007).
124. Karlsson, M., Mathers, J., Dickinson, R. J., Mandl, M. & Keyse, S. M. Both nuclear-cytoplasmic shuttling of the dual specificity phosphatase MKP-3 and its ability to anchor MAP kinase in the cytoplasm are mediated by a conserved nuclear export signal. *J. Biol. Chem.* **279**, 41882–41891 (2004).

125. Adachi, M., Fukuda, M. & Nishida, E. Nuclear export of MAP kinase (ERK) involves a MAP kinase kinase (MEK)-dependent active transport mechanism. *J. Cell Biol.* **148**, 849–856 (2000).
126. Fukuda, M., Gotoh, I., Adachi, M., Gotoh, Y. & Nishida, E. A novel regulatory mechanism in the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade. Role of nuclear export signal of MAP kinase kinase. *J. Biol. Chem.* **272**, 32642–32648 (1997).
127. Huang, C.-Y. & Tan, T.-H. DUSPs, to MAP kinases and beyond. *Cell Biosci.* **2**, 24 (2012).
128. Tanoue, T., Adachi, M., Moriguchi, T. & Nishida, E. A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat. Cell Biol.* **2**, 110–116 (2000).
129. Marchetti, S. *et al.* Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate mitogen-activated protein kinase phosphatase 3/DUSP6 at serines 159 and 197, two sites critical for its proteasomal degradation. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 854–864 (2005).
130. Fjeld, C. C., Rice, A. E., Kim, Y., Gee, K. R. & Denu, J. M. Mechanistic basis for catalytic activation of mitogen-activated protein kinase phosphatase 3 by extracellular signal-regulated kinase. *J. Biol. Chem.* **275**, 6749–6757 (2000).
131. Farooq, A. *et al.* Solution Structure of ERK2 Binding Domain of MAPK Phosphatase MKP-3: Structural Insights into MKP-3 Activation by ERK2. *Mol. Cell* **7**, 387–399 (2001).
132. Camps, M. *et al.* Catalytic activation of the phosphatase MKP-3 by ERK2 mitogen-activated protein kinase. *Science* **280**, 1262–1265 (1998).
133. Ekerot, M. *et al.* Negative-feedback regulation of FGF signalling by DUSP6/MKP-3 is driven by ERK1/2 and mediated by Ets factor binding to a conserved site within the DUSP6/MKP-3 gene promoter. *Biochem. J.* **412**, 287–298 (2008).

134. Nunes-Xavier, C. E. *et al.* Differential up-regulation of MAP kinase phosphatases MKP3/DUSP6 and DUSP5 by Ets2 and c-Jun converge in the control of the growth arrest versus proliferation response of MCF-7 breast cancer cells to phorbol ester. *J. Biol. Chem.* **285**, 26417–26430 (2010).
135. Lake, D., Corrêa, S. A. L. & Müller, J. Negative feedback regulation of the ERK1/2 MAPK pathway. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **73**, 4397 (2016).
136. Avraham, R. & Yarden, Y. Feedback regulation of EGFR signalling: decision making by early and delayed loops. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 104–117 (2011).
137. Amit, I. *et al.* A module of negative feedback regulators defines growth factor signaling. *Nat. Genet.* **39**, 503–512 (2007).
138. Maria Grazia Giovannini. The Role of the Extracellular Signal-regulated Kinase Pathway in Memory Encoding. *Rev. Neurosci.* **17**, 619–634 (2006).
139. Adams, J. P. & Sweatt, J. D. Molecular Psychology: Roles for the ERK MAP Kinase Cascade in Memory. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **42**, 135–163 (2002).
140. Selcher, J. C. *et al.* A Role for ERK MAP Kinase in Physiologic Temporal Integration in Hippocampal Area CA1. *Learn. Mem.* **10**, 26–39 (2003).
141. Cestari, V., Rossi-Arnaud, C., Saraulli, D. & Costanzi, M. The MAP(K) of fear: From memory consolidation to memory extinction. *Brain Res. Bull.* **105**, 8–16 (2014).
142. Giovannini, M. G., Lana, D. & Pepeu, G. The integrated role of ACh, ERK and mTOR in the mechanisms of hippocampal inhibitory avoidance memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* **119**, 18–33 (2015).
143. Lee, Y.-S. *et al.* Mechanism and treatment for learning and memory deficits in mouse models of Noonan syndrome. *Nat. Neurosci.* **17**, 1736–1743 (2014).

144. Feld, M. *et al.* Decrease of ERK/MAPK overactivation in prefrontal cortex reverses early memory deficit in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* **40**, 69–82 (2014).
145. Krawczyk, M. C., Millan, J., Blake, M. G., Feld, M. & Boccia, M. M. Relevance of ERK1/2 Post-retrieval Participation on Memory Processes: Insights in Their Particular Role on Reconsolidation and Persistence of Memories. *Front. Mol. Neurosci.* **12**, 95 (2019).
146. Krawczyk, M. C. *et al.* Memory reconsolidation of an inhibitory avoidance task in mice involves cytosolic ERK2 bidirectional modulation. *Neuroscience* **294**, 227–237 (2015).
147. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. (National Academies Press (US), Washington (DC), 2011).
148. Boccia, M. M., Acosta, G. B., Blake, M. G. & Baratti, C. M. Memory consolidation and reconsolidation of an inhibitory avoidance response in mice: effects of i.c.v. injections of hemicholinium-3. *Neuroscience* **124**, 735–741 (2004).
149. Blake, M. G., Boccia, M. M. & Baratti, C. M. Behavioral differences on memory retrieval between two variants of step-through inhibitory avoidance task in mice. *Neurosci. Lett.* **444**, 102–105 (2008).
150. Krawczyk, M. C., Millan, J., Blake, M. G. & Boccia, M. M. Role of prediction error and the cholinergic system on memory reconsolidation processes in mice. *Neurobiol. Learn. Mem.* **185**, 107534 (2021).
151. Paxinos, G. & Franklin, K. B. J. *Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. (Academic Press, 2019).
152. Analysis of ERKs' Dimerization by Electrophoresis | Springer Nature Experiments. [https://experiments.springernature.com/articles/10.1007/978-1-60761-795-2\\_20](https://experiments.springernature.com/articles/10.1007/978-1-60761-795-2_20).

153. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
154. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 671–675 (2012).
155. Western blot membrane stripping for restaining protocol | Abcam.  
<https://www.abcam.com/protocols/western-blot-membrane-stripping-for-restaining-protocol>.
156. Chaudhuri, A., Zangenehpour, S., Rahbar-Dehgan, F. & Ye, F. Molecular maps of neural activity and quiescence. *Acta Neurobiol. Exp. (Warsz.)* **60**, 403–410 (2000).
157. Herdegen, T. & Leah, J. D. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res. Rev.* **28**, 370–490 (1998).
158. Morgan, J. I., Cohen, D. R., Hempstead, J. L. & Curran, T. Mapping Patterns of c-fos Expression in the Central Nervous System After Seizure. *Science* **237**, 192–197 (1987).
159. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. *R Found. Stat. Comput.* (2021).
160. RStudio Team. RStudio: Integrated Development Environment for R. *RStudio PBC* (2020).
161. Brooks, M. E. *et al.* glmmTMB Balances Speed and Flexibility Among Packages for Zero-inflated Generalized Linear Mixed Modeling. *R J.* **9**, 378–400 (2017).
162. Florian Hartig. DHARMA: Residual Diagnostics for Hierarchical (Multi-Level / Mixed) Regression Models. (2022).
163. Russell V. Lenth. emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. (2024).

164. Ho, J., Tumkaya, T., Aryal, S., Choi, H. & Claridge-Chang, A. Moving beyond P values: data analysis with estimation graphics. *Nat. Methods* **16**, 565–566 (2019).
165. Claridge-Chang, A. & Assam, P. N. Estimation statistics should replace significance testing. *Nat. Methods* **13**, 108–109 (2016).
166. Yang, Y. *et al.* Structure-activity relationship study of DEL-22379: ERK dimerization inhibitors with increased safety. *Mol. Divers.* **25**, 1051–1075 (2021).
167. Whitlock, J. R., Heynen, A. J., Shuler, M. G. & Bear, M. F. Learning Induces Long-Term Potentiation in the Hippocampus. *Science* **313**, 1093–1097 (2006).
168. Bliss, T. V. P. & Collingridge, G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**, 31–39 (1993).
169. Pastalkova, E. *et al.* Storage of Spatial Information by the Maintenance Mechanism of LTP. *Science* **313**, 1141–1144 (2006).
170. Bliss, T. V. P. *et al.* Elements of a neurobiological theory of the hippocampus: the role of activity-dependent synaptic plasticity in memory. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **358**, 773–786 (2003).
171. Dudai, Y. & Eisenberg, M. Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron* **44**, 93–100 (2004).
172. Rescorla, R. A. Spontaneous Recovery. *Learn. Mem.* **11**, 501–509 (2004).
173. Casar, B. *et al.* Ras Subcellular Localization Defines Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 and 2 Substrate Specificity through Distinct Utilization of Scaffold Proteins. *Mol. Cell. Biol.* (2009) doi:10.1128/MCB.01359-08.
174. Brown, M. D. & Sacks, D. B. Protein scaffolds in MAP kinase signalling. *Cell. Signal.* **21**, 462–469 (2009).

175. Kidger, A. M. *et al.* Dual-specificity phosphatase 5 controls the localized inhibition, propagation, and transforming potential of ERK signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, E317–E326 (2017).
176. Caunt, C. J., Kidger, A. M. & Keyse, S. M. Visualizing and Quantitating the Spatiotemporal Regulation of Ras/ERK Signaling by Dual-Specificity Mitogen-Activated Protein Phosphatases (MKPs). in *Protein Tyrosine Phosphatases: Methods and Protocols* (ed. Pulido, R.) 197–215 (Springer, New York, NY, 2016). doi:10.1007/978-1-4939-3746-2\_12.
177. Buffet, C. *et al.* DUSP5 and DUSP6, two ERK specific phosphatases, are markers of a higher MAPK signaling activation in BRAF mutated thyroid cancers. *PLOS ONE* **12**, e0184861 (2017).
178. Zaballos, M. A. *et al.* Inhibiting ERK dimerization ameliorates BRAF-driven anaplastic thyroid cancer. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **79**, 504 (2022).
179. Fortin, D. A. *et al.* Long-Term Potentiation-Dependent Spine Enlargement Requires Synaptic Ca<sup>2+</sup>-Permeable AMPA Receptors Recruited by CaM-Kinase I. *J. Neurosci.* **30**, 11565–11575 (2010).
180. Franchini, L. *et al.* Linking NMDA Receptor Synaptic Retention to Synaptic Plasticity and Cognition. *iScience* **19**, 927–939 (2019).
181. Li, Y.-H. & Wang, J. Membrane insertion of new AMPA receptors and LTP induced by glycine is prevented by blocking NR2A-containing NMDA receptors in the rat visual cortex in vitro. *Curr. Neurovasc. Res.* **10**, 70–75 (2013).
182. Zhang, X.-Y. *et al.* Glycine Induces Bidirectional Modifications in N-Methyl-d-aspartate Receptor-mediated Synaptic Responses in Hippocampal CA1 Neurons \*. *J. Biol. Chem.* **289**, 31200–31211 (2014).

183. Broussard, J. I. *et al.* Dopamine Regulates Aversive Contextual Learning and Associated In Vivo Synaptic Plasticity in the Hippocampus. *Cell Rep.* **14**, 1930–1939 (2016).
184. Impey, S. *et al.* Cross Talk between ERK and PKA Is Required for Ca<sup>2+</sup> Stimulation of CREB-Dependent Transcription and ERK Nuclear Translocation. *Neuron* **21**, 869–883 (1998).
185. Kelleher, R. J., Govindarajan, A., Jung, H.-Y., Kang, H. & Tonegawa, S. Translational Control by MAPK Signaling in Long-Term Synaptic Plasticity and Memory. *Cell* **116**, 467–479 (2004).
186. Winder, D. G. *et al.* ERK Plays a Regulatory Role in Induction of LTP by Theta Frequency Stimulation and Its Modulation by  $\beta$ -Adrenergic Receptors. *Neuron* **24**, 715–726 (1999).
187. Opazo, P., Watabe, A. M., Grant, S. G. N. & O'Dell, T. J. Phosphatidylinositol 3-Kinase Regulates the Induction of Long-Term Potentiation through Extracellular Signal-Related Kinase-Independent Mechanisms. *J. Neurosci.* **23**, 3679–3688 (2003).
188. Mazzucchelli, C. *et al.* Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron* **34**, 807–820 (2002).
189. Molina, G. *et al.* Zebrafish chemical screening reveals an inhibitor of Dusp6 that expands cardiac cell lineages. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 680–687 (2009).
190. Chen, J., Rusnak, M., Luedtke, R. R. & Sidhu, A. D1 Dopamine Receptor Mediates Dopamine-induced Cytotoxicity via the ERK Signal Cascade \*. *J. Biol. Chem.* **279**, 39317–39330 (2004).



191. Krawczyk, M. del C. Participación del sistema colinérgico y de la vía de señalización ERK/MAPKs en los procesos de reconsolidación de la memoria. (Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, 2017).
192. Grissom, N. M. & Bhatnagar, S. The basolateral amygdala regulates adaptation to stress via  $\beta$ -adrenergic receptor-mediated reductions in phosphorylated extracellular signal-regulated kinase. *Neuroscience* **178**, 108–122 (2011).
193. Huang, F., Chotiner, J. K. & Steward, O. Actin Polymerization and ERK Phosphorylation Are Required for Arc/Arg3.1 mRNA Targeting to Activated Synaptic Sites on Dendrites. *J. Neurosci.* **27**, 9054–9067 (2007).
194. Muda, M. *et al.* MKP-3, a Novel Cytosolic Protein-tyrosine Phosphatase That Exemplifies a New Class of Mitogen-activated Protein Kinase Phosphatase (\*). *J. Biol. Chem.* **271**, 4319–4326 (1996).
195. Ndong, C., Landry, R. P., Saha, M. & Romero-Sandoval, E. A. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase-3 (MKP-3) displays a p-JNK-MAPK substrate preference in astrocytes *in vitro*. *Neurosci. Lett.* **575**, 13–18 (2014).
196. Shillingford, S. R. & Bennett, A. M. Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatases: No Longer Undruggable? *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **63**, 617–636 (2023).
197. Pérez-Sen, R. *et al.* Dual-Specificity Phosphatase Regulation in Neurons and Glial Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1999 (2019).
198. Wang, S. *et al.* BCI Improves Alcohol-Induced Cognitive and Emotional Impairments by Restoring pERK-BDNF. *J. Mol. Neurosci.* **74**, 59 (2024).
199. Cruz, F. C. *et al.* New technologies for examining the role of neuronal ensembles in drug addiction and fear. *Nat. Rev. Neurosci.* **14**, 743–754 (2013).

200. Boccia, M. *et al.* Activation of hippocampal nuclear factor-kappa B by retrieval is required for memory reconsolidation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **27**, 13436–13445 (2007).
201. Roozendaal, B., McEwen, B. S. & Chattarji, S. Stress, memory and the amygdala. *Nat. Rev. Neurosci.* **10**, 423–433 (2009).
202. McGaugh, J. L. THE AMYGDALA MODULATES THE CONSOLIDATION OF MEMORIES OF EMOTIONALLY AROUSING EXPERIENCES. *Annu. Rev. Neurosci.* **27**, 1–28 (2004).
203. Roesler, R., Parent, M. B., LaLumiere, R. T. & McIntyre, C. K. Amygdala-hippocampal interactions in synaptic plasticity and memory formation. *Neurobiol. Learn. Mem.* **184**, 107490 (2021).
204. Alexander, A. S., Place, R., Starrett, M. J., Chrastil, E. R. & Nitz, D. A. Rethinking retrosplenial cortex: Perspectives and predictions. *Neuron* **111**, 150–175 (2023).
205. Vedder, L. C., Miller, A. M. P., Harrison, M. B. & Smith, D. M. Retrosplenial Cortical Neurons Encode Navigational Cues, Trajectories and Reward Locations During Goal Directed Navigation. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* **27**, 3713–3723 (2017).
206. Corcoran, K. A., Yamawaki, N., Leaderbrand, K. & Radulovic, J. Role of retrosplenial cortex in processing stress-related context memories. *Behav. Neurosci.* **132**, 388–395 (2018).
207. Katche, C. & Medina, J. H. Requirement of an Early Activation of BDNF/c-Fos Cascade in the Retrosplenial Cortex for the Persistence of a Long-Lasting Aversive Memory. *Cereb. Cortex* **27**, 1060–1067 (2017).
208. Katche, C. *et al.* On the role of retrosplenial cortex in long-lasting memory storage. *Hippocampus* **23**, 295–302 (2013).

209. Blake, M. G., Boccia, M. M., Krawczyk, M. C. & Baratti, C. M. Hippocampal  $\alpha 7$ -nicotinic cholinergic receptors modulate memory reconsolidation: A potential strategy for recovery from amnesia. *Neurobiol. Learn. Mem.* **106**, 193–203 (2013).
210. Blake, M. G., Boccia, M. M., Krawczyk, M. C., Delorenzi, A. & Baratti, C. M. Choline reverses scopolamine-induced memory impairment by improving memory reconsolidation. *Neurobiol. Learn. Mem.* **98**, 112–121 (2012).
211. Krawczyk, M. C. *et al.* Reconsolidation-induced memory persistence: Participation of late phase hippocampal ERK activation. *Neurobiol. Learn. Mem.* **133**, 79–88 (2016).
212. Boccia, M. M., Blake, M. G., Krawczyk, M. C. & Baratti, C. M. Hippocampal  $\alpha 7$  nicotinic receptors modulate memory reconsolidation of an inhibitory avoidance task in mice. *Neuroscience* **171**, 531–543 (2010).
213. Fanselow, M. S. & Dong, H.-W. Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? *Neuron* **65**, 7–19 (2010).
214. Gilbert, P. E. & Kesner, R. P. The role of the dorsal CA3 hippocampal subregion in spatial working memory and pattern separation. *Behav. Brain Res.* **169**, 142–149 (2006).
215. Gilbert, P. E., Kesner, R. P. & Lee, I. Dissociating hippocampal subregions: A double dissociation between dentate gyrus and CA1. *Hippocampus* **11**, 626–636 (2001).
216. Hunsaker, M. R., Thorup, J. A., Welch, T. & Kesner, R. P. The role of CA3 and CA1 in the acquisition of an object-trace-place paired-associate task. *Behav. Neurosci.* **120**, 1252–1256 (2006).
217. Jerman, T., Kesner, R. P. & Hunsaker, M. R. Disconnection analysis of CA3 and DG in mediating encoding but not retrieval in a spatial maze learning task. *Learn. Mem.* **13**, 458–464 (2006).

218. Kesner, R. P. & Hopkins, R. O. Mnemonic functions of the hippocampus: A comparison between animals and humans. *Biol. Psychol.* **73**, 3–18 (2006).
219. Leutgeb, S., Leutgeb, J. K., Treves, A., Moser, M.-B. & Moser, E. I. Distinct Ensemble Codes in Hippocampal Areas CA3 and CA1. *Science* **305**, 1295–1298 (2004).
220. Vazdarjanova, A. & Guzowski, J. F. Differences in Hippocampal Neuronal Population Responses to Modifications of an Environmental Context: Evidence for Distinct, Yet Complementary, Functions of CA3 and CA1 Ensembles. *J. Neurosci.* **24**, 6489–6496 (2004).
221. Lee, I., Hunsaker, M. R. & Kesner, R. P. The Role of Hippocampal Subregions in Detecting Spatial Novelty. *Behav. Neurosci.* **119**, 145–153 (2005).
222. Leroy, F. *et al.* A circuit from hippocampal CA2 to lateral septum disinhibits social aggression. *Nature* **564**, 213–218 (2018).
223. Piskorowski, R. A. *et al.* Age-Dependent Specific Changes in Area CA2 of the Hippocampus and Social Memory Deficit in a Mouse Model of the 22q11.2 Deletion Syndrome. *Neuron* **89**, 163–176 (2016).
224. Alexander, G. M. *et al.* Modulation of CA2 neuronal activity increases behavioral responses to fear conditioning in female mice. *Neurobiol. Learn. Mem.* **163**, 107044 (2019).
225. Smith, A. S., Williams Avram, S. K., Cymerblit-Sabba, A., Song, J. & Young, W. S. Targeted activation of the hippocampal CA2 area strongly enhances social memory. *Mol. Psychiatry* **21**, 1137–1144 (2016).
226. Kassraian, P. *et al.* The hippocampal CA2 region discriminates social threat from social safety. *Nat. Neurosci.* **27**, 2193–2206 (2024).

227. Rolls, E. T., Treves, A., Foster, D. & Perez-Vicente, C. Simulation studies of the CA3 hippocampal subfield modelled as an attractor neural network. *Neural Netw.* **10**, 1559–1569 (1997).
228. Lux, V., Atucha, E., Kitsukawa, T. & Sauvage, M. M. Imaging a memory trace over half a life-time in the medial temporal lobe reveals a time-limited role of CA3 neurons in retrieval. *eLife* **5**, e11862 (2016).
229. Atucha, E., Ku, S.-P., Lippert, M. T. & Sauvage, M. M. Recalling gist memory depends on CA1 hippocampal neurons for lifetime retention and CA3 neurons for memory precision. *Cell Rep.* **42**, (2023).
230. Lassalle, J.-M., Bataille, T. & Halley, H. Reversible Inactivation of the Hippocampal Mossy Fiber Synapses in Mice Impairs Spatial Learning, but neither Consolidation nor Memory Retrieval, in the Morris Navigation Task. *Neurobiol. Learn. Mem.* **73**, 243–257 (2000).
231. Madroñal, N. *et al.* Rapid erasure of hippocampal memory following inhibition of dentate gyrus granule cells. *Nat. Commun.* **7**, 10923 (2016).
232. Kheirbek, M. A. *et al.* Differential Control of Learning and Anxiety along the Dorsoventral Axis of the Dentate Gyrus. *Neuron* **77**, 955–968 (2013).
233. Guskjolen, A. *et al.* Recovery of “Lost” Infant Memories in Mice. *Curr. Biol.* **28**, 2283–2290.e3 (2018).
234. Redondo, R. L. *et al.* Bidirectional switch of the valence associated with a hippocampal contextual memory engram. *Nature* **513**, 426–430 (2014).
235. Amorapanth, P., LeDoux, J. E. & Nader, K. Different lateral amygdala outputs mediate reactions and actions elicited by a fear-arousing stimulus. *Nat. Neurosci.* **3**, 74–79 (2000).

236. Choi, J.-S., Cain, C. K. & LeDoux, J. E. The role of amygdala nuclei in the expression of auditory signaled two-way active avoidance in rats. *Learn. Mem.* **17**, 139–147 (2010).
237. Lázaro-Muñoz, G., LeDoux, J. E. & Cain, C. K. Sidman Instrumental Avoidance Initially Depends on Lateral and Basal Amygdala and Is Constrained by Central Amygdala-Mediated Pavlovian Processes. *Biol. Psychiatry* **67**, 1120–1127 (2010).
238. Izquierdo, I. *et al.* Sequential Role of Hippocampus and Amygdala, Entorhinal Cortex and Parietal Cortex in Formation and Retrieval of Memory for Inhibitory Avoidance in Rats. *Eur. J. Neurosci.* **9**, 786–793 (1997).
239. Izquierdo, I. *et al.* Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. *Behav. Neural Biol.* **58**, 16–26 (1992).
240. Bonini, J. S. *et al.* AMPA/kainate and group-I metabotropic receptor antagonists infused into different brain areas impair memory formation of inhibitory avoidance in rats. *Behav. Pharmacol.* **14**, 161 (2003).
241. Lee, S. A. *et al.* Brain representations of affective valence and intensity in sustained pleasure and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **121**, e2310433121 (2024).
242. Iwaoki, H. & Nakamura, K. Neuronal Encoding of Emotional Valence and Intensity in the Monkey Amygdala. *J. Neurosci.* **42**, 7615–7623 (2022).
243. Kryklywy, J. H., Nantes, S. G. & Mitchell, D. G. V. The amygdala encodes level of perceived fear but not emotional ambiguity in visual scenes. *Behav. Brain Res.* **252**, 396–404 (2013).
244. Wang, S. *et al.* The human amygdala parametrically encodes the intensity of specific facial emotions and their categorical ambiguity. *Nat. Commun.* **8**, 14821 (2017).

245. Michely, J., Rigoli, F., Rutledge, R. B., Hauser, T. U. & Dolan, R. J. Distinct Processing of Aversive Experience in Amygdala Subregions. *Biol. Psychiatry Cogn. Neurosci. Neuroimaging* **5**, 291–300 (2020).
246. Malinowska, M., Niewiadomska, M. & Wesierska, M. Spatial memory formation differentially affects c-Fos expression in retrosplenial areas during place avoidance training in rats. *Acta Neurobiol. Exp. (Warsz.)* **76**, 244–265 (2016).
247. Trask, S., Ferrara, N. C., Grisales, K. & Helmstetter, F. J. Optogenetic inhibition of either the anterior or posterior retrosplenial cortex disrupts retrieval of a trace, but not delay, fear memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* **185**, 107530 (2021).
248. Trask, S. & Helmstetter, F. J. Unique roles for the anterior and posterior retrosplenial cortices in encoding and retrieval of memory for context. *Cereb. Cortex* **32**, 3602–3610 (2022).
249. Lukoyanov, N. V. & Lukoyanova, E. A. Retrosplenial cortex lesions impair acquisition of active avoidance while sparing fear-based emotional memory. *Behav. Brain Res.* **173**, 229–236 (2006).
250. Kwapis, J. L., Jarome, T. J., Lee, J. L. & Helmstetter, F. J. The retrosplenial cortex is involved in the formation of memory for context and trace fear conditioning. *Neurobiol. Learn. Mem.* **123**, 110–116 (2015).
251. Sporns, O., Honey, C. J. & Kötter, R. Identification and Classification of Hubs in Brain Networks. *PLOS ONE* **2**, e1049 (2007).
252. Sugar, J., Witter, M. P., van Strien, N. & Cappaert, N. The Retrosplenial Cortex: Intrinsic Connectivity and Connections with the (Para)Hippocampal Region in the Rat. An Interactive Connectome. *Front. Neuroinformatics* **5**, (2011).
253. van Groen, T. & Michael Wyss, J. Connections of the retrosplenial granular a cortex in the rat. *J. Comp. Neurol.* **300**, 593–606 (1990).

254. Van Groen, T. & Wyss, J. M. Connections of the retrosplenial granular b cortex in the rat. *J. Comp. Neurol.* **463**, 249–263 (2003).
255. Dalton, M. A., McCormick, C. & Maguire, E. A. Differences in functional connectivity along the anterior-posterior axis of human hippocampal subfields. *NeuroImage* **192**, 38–51 (2019).
256. Frankland, P. W., Bontempi, B., Talton, L. E., Kaczmarek, L. & Silva, A. J. The Involvement of the Anterior Cingulate Cortex in Remote Contextual Fear Memory. *Science* **304**, 881–883 (2004).
257. Bontempi, B., Laurent-Demir, C., Destrade, C. & Jaffard, R. Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature* **400**, 671–675 (1999).
258. Frankland, P. W. & Bontempi, B. The organization of recent and remote memories. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 119–130 (2005).
259. Bero, A. W. *et al.* Early remodeling of the neocortex upon episodic memory encoding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 11852–11857 (2014).
260. Rajasethupathy, P. *et al.* Projections from neocortex mediate top-down control of memory retrieval. *Nature* **526**, 653–659 (2015).
261. Rizzo, V. *et al.* Encoding of Contextual Fear Memory Requires De Novo Proteins in the Prelimbic Cortex. *Biol. Psychiatry Cogn. Neurosci. Neuroimaging* **2**, 158–169 (2017).
262. Matos, M. R. *et al.* Memory strength gates the involvement of a CREB-dependent cortical fear engram in remote memory. *Nat. Commun.* **10**, 2315 (2019).
263. Sierra-Mercado, D., Padilla-Coreano, N. & Quirk, G. J. Dissociable Roles of Prelimbic and Infralimbic Cortices, Ventral Hippocampus, and Basolateral Amygdala in the Expression and Extinction of Conditioned Fear. *Neuropsychopharmacology* **36**, 529–538 (2011).



264. Dejean, C. *et al.* Prefrontal neuronal assemblies temporally control fear behaviour. *Nature* **535**, 420–424 (2016).
265. Jo, Y. S. *et al.* The Medial Prefrontal Cortex Is Involved in Spatial Memory Retrieval under Partial-Cue Conditions. *J. Neurosci.* **27**, 13567–13578 (2007).
266. Sun, X. *et al.* Functionally Distinct Neuronal Ensembles within the Memory Engram. *Cell* **181**, 410–423.e17 (2020).